



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**FUNGOS BASIDIOMICETOS DE SOLOS DE RECUO DA
GELEIRA COLLINS (ANTÁRTICA):
CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA E APLICAÇÃO
AMBIENTAL**

GABRIELE SANTANA DE FARIAS

Orientadora: Lara Durães Sette
Coorientadora: Patrícia Giovanella

Rio Claro – SP

2022

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**FUNGOS BASIDIOMICETOS DE SOLOS DE RECUO DA
GELEIRA COLLINS (ANTÁRTICA):
CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA E APLICAÇÃO
AMBIENTAL**

Gabriele Santana de Farias

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências do Câmpus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Microbiologia Aplicada.

Orientadora: Lara Durães Sette
Coorientadora: Patrícia Giovanella

Rio Claro – SP
2022

F224f

Farias, Gabriele Santana de

Fungos basidiomicetos de solos de recuo da geleira Collins
(Antártica) : caracterização taxonômica e aplicação ambiental /
Gabriele Santana de Farias. -- Rio Claro, 2022

78 f. : il., tabs., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Lara Durães Sette

Coorientadora: Patrícia Giovanella

1. Basidiomicetos antárticos. 2. Biorremediação. 3. Vermelho
Congo. 4. Óleo diesel. 5. Geleira Collins. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

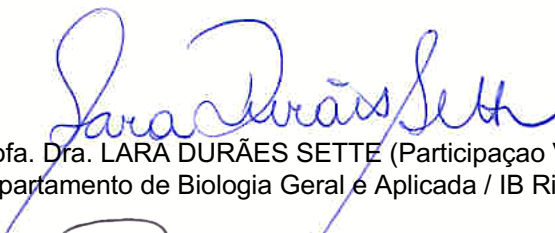
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

FUNGOS BASIDIOMICETOS DE SOLOS DE RECUELO DA GELEIRA COLLINS (ANTÁRTICA): CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA E APLICAÇÃO AMBIENTAL

**AUTORA: GABRIELE SANTANA DE
FARIAS ORIENTADORA: LARA DURÃES
SETTE COORIENTADORA: PATRICIA
GIOVANELLA**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. LARA DURÃES SETTE (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro



Profa. Dra. SUELY MAYUMI OBARA DOI (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Biotecnologia / Universidade Estadual de Londrina - UEL – Londrina



Profa. Dra. RAFAELLA COSTA BONUGLI SANTOS (Participação Virtual)
Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza / Universidade Federal da Integração Latino-Americana

Rio Claro, 07 de março de 2022

Dedico este trabalho ao Minho, o gato mais maneiro que já existiu, que acompanhou todas as minhas conquistas por 16 anos e me salvou de mim mesma. Obrigada por tanto.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Marilene e Marcelino, pelo apoio, incentivo e confiança nas minhas escolhas. Ter uma filha bióloga e cientista é a causa de muitos cabelos brancos, mas vocês estão sempre torcendo para que tudo dê certo.

Aos amigos, que fazem a caminhada ser mais leve: Thaís, por compartilhar surtos, livros e comidas, fico feliz demais por nossa aproximação (mesmo que tardia), torço muito pelo seu sucesso e espero um dia ser uma cientista tão incrível quanto você. Luana e Tamiris, por me apoiarem e escutarem todos os meus dramas, por estarem sempre pertinho, mesmo que longe, amo vocês e preparem-se para me aguentar por mais muitos anos ainda. Aos meninos, Álvaro, João e Trentin, que também continuam perto, seja pra surtar sobre a falta de emprego para microbiologista, para jogar Pokémon Go ou pra me acolher com muito carinho em casa. Aos amigos que o tempo e a distância levaram um pouquinho pra longe: Letícia, Maycon e Sthefani, ver as conquistas de vocês me enche de orgulho.

Ao Lucas, meu parcinha de vida, por ser um otaku twitteiro jogador de Pokémon Go: a vida é cheia de coincidências, mas essa foi de longe a melhor. A distância e a saudade são difíceis, mas você tá sempre aqui, todo dia, me apoiando em tudo. Ainda teremos muitas viagens, post-its, risadas, tatakae, shinys (só meus), naninhas e joguinhos bestas que nos deixam estressados. Amo você, tá?

Aos meus gatos: Minho, que foi minha felicidade por 16 anos, e Flufo e Panterinha, que assumiram o cargo agora. Miau pra vocês também.

À minha orientadora, Dra. Lara Sette, por ter confiado no meu trabalho nesses cinco anos que fiz parte do LAMAI. À minha coorientadora, Patrícia Giovanella, pelo auxílio nas análises e por compartilhar fotos de gatinhos. E aos colegas de laboratório, que compartilham as dificuldades de fazer ciências no cenário atual.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida no decorrer do mestrado.

Resumo

O continente antártico possui condições ambientais extremas, as quais promovem uma pressão seletiva e resulta no desenvolvimento de adaptações para que os micro-organismos possam sobreviver. Devido a mudanças climáticas, as geleiras da Antártica estão sofrendo um processo de retração, propiciando um novo hábitat para micro-organismos no solo recém-exposto. Fungos basidiomicetos provenientes de solos de recuo da geleira Collins, coletados na OPERANTAR XXXIII (2015), foram utilizados no presente estudo, com o objetivo de avançar na identificação taxonômica e verificar a capacidade de descoloração, destoxificação e adsorção do corante azo Vermelho Congo, bem como a capacidade de se desenvolver na presença do óleo diesel. Os isolados foram identificados como *Pholiota* cf. *baeosperma* (320 e 344), *Schizophyllum* sp. (58) e *Aleurodiscus* sp. (177). Os melhores resultados para descoloração, nas concentrações de 50 e 100 mg/L de corante, foram apresentados pelos fungos *Pholiota* cf. *baeosperma* 320 e *Schizophyllum* sp. 58 após sete dias de cultivo a 25 °C. Todos os fungos apresentaram atividade enzimática para lacase, sendo a maior atividade (8,8 U/L) obtida para o fungo *Pholiota* cf. *baeosperma* 320 na concentração de 100 mg/L do corante. Na cinética de descoloração, *Pholiota* cf. *baeosperma* 320 e 344 apresentaram uma média de 70% de descoloração desde o primeiro dia do experimento, enquanto *Schizophyllum* 58 alcançou um máximo de descoloração (acima de 90%) no sétimo dia do experimento e *Aleurodiscus* sp. 177 apresentou uma diminuição de 10 % na descoloração no sétimo dia do experimento. Quanto à fitotoxicidade, os fungos *Aleurodiscus* sp. 177 e *Pholiota* cf. *baeosperma* 320 e 344 diminuíram em 100 % a toxicidade na concentração de 50 mg/L e, ao aumentar a concentração para 100 mg/L, a toxicidade após o tratamento foi maior, o que indica que compostos tóxicos podem ter sido gerados na quebra da molécula do corante Vermelho Congo. Para o fungo *Schizophyllum* sp. 58, a toxicidade diminuiu nas duas concentrações testadas. O fungo *Aleurodiscus* sp. 177 foi o que apresentou o maior resultado de adsorção (96 %), melhorando o desempenho em relação ao ensaio com o micélio ativo, onde a descoloração foi de 55 %. O fungo *Schizophyllum* sp. 58 não apresentou diferença entre os ensaios de adsorção e descoloração. Para os fungos *Pholiota* cf. *baeosperma* 320 e 344 a adsorção pelo micélio inativo foi menor do que no ensaio com os fungos ativos. Os dados relacionados com a detecção de metabólitos de degradação do Vermelho Congo (análises de GC-MS) indicam que a descoloração do corante pelo fungo *Pholiota* cf. *baeosperma* 344 ocorreu principalmente por mecanismos enzimáticos, enquanto que para o fungo *Schizophyllum* sp. 58 o principal mecanismo foi a adsorção. Alguns metabólitos detectados como éster de ácido ftálico, ácido oxálico e benzeno são fitotóxicos. O fungo *Schizophyllum* sp. 58 foi o único que apresentou crescimento micelial em meio de cultura contendo apenas o óleo diesel como fonte de carbono. Os resultados obtidos no presente estudo indicam que os fungos basidiomicetos de origem Antártica podem ser uma nova alternativa para a biorremediação de compostos xenobióticos poluentes ambientais.

Palavras-chave: Basidiomicetos antárticos; Biorremediação; Vermelho Congo; óleo diesel; geleira Collins.

Abstract

The Antarctic continent has extreme environmental conditions, which promote selective pressure and result in the development of adaptations for microorganisms to survive. Due to climate change, the Antarctic glaciers are undergoing a retreating process, providing new habitat for microorganisms in the newly exposed soil. Basidiomycete fungi from Collins Glacier retreat soils, collected in the OPERANTAR XXXIII (2015), were used in this study to advance in the taxonomic identification and to verify their ability to decolorize, detoxify and adsorb the azo dye Congo Red, as well as their ability to grow in the presence of diesel oil. The isolates were identified as *Pholiota* cf. *baeosperma* (320 and 344), *Schizophyllum* sp. (58) and *Aleurodiscus* sp. (177). The best results for decolorization, at concentrations of 50 and 100 mg/L of the dye, were presented by the fungi *Pholiota* cf. *baeosperma* 320 and *Schizophyllum* sp. 58 after 7 days of cultivation at 25 °C. All fungi showed lacase enzymatic activity, with the highest activity (8.8 U/L) obtained for *Pholiota* cf. *baeosperma* 320 at 100 mg/L of the dye. In the decolorization kinetics, *Pholiota* cf. *baeosperma* 320 and 344 presented an average of 70% of decolorization since the first day of the experiment, while *Schizophyllum* 58 reached a maximum of decolorization (above 90%) on the seventh day of the experiment and *Aleurodiscus* sp. 177 presented a 10% decrease in decolorization on the seventh day of the experiment. Regarding phytotoxicity, the fungi *Aleurodiscus* sp. 177 and *Pholiota* cf. *baeosperma* 320 and 344 decreased 100 % of the toxicity at the concentration of 50 mg/L, and when the concentration was increased to 100 mg/L, the toxicity after the treatment was higher, which indicates that toxic compounds may have been generated in the breakdown of the Congo Red dye molecule. For the fungus *Schizophyllum* sp. 58, the toxicity decreased at the two concentrations tested. The fungus *Aleurodiscus* sp. 177 showed the highest adsorption result (96 %), improving the performance compared to the assay with active mycelium, where the decolorization was 55 %. The fungus *Schizophyllum* sp. 58 showed no difference between the adsorption and decolorization assays. For the fungi *Pholiota* cf. *baeosperma* 320 and 344 the adsorption by the inactive mycelium was lower than in the assay with the active fungi. Data related to the detection of Congo Red degradation metabolites (GC-MS analyses) indicate that dye decolorization by the fungus *Pholiota* cf. *baeosperma* 344 occurred mainly by enzymatic mechanisms, while for the fungus *Schizophyllum* sp. 58 the main mechanism was adsorption. Some metabolites detected such as phthalic acid ester, oxalic acid, and benzene are phytotoxic. The fungus *Schizophyllum* sp. 58 was the only one that showed mycelial growth in culture medium containing only diesel oil as a carbon source. The results obtained in the present study indicate that basidiomycete fungi of Antarctic origin can be a new alternative for the bioremediation of xenobiotic environmental pollutants compounds.

Keywords: Antarctic basidiomycete; bioremediation; Congo red; diesel oil; Collins glacier.

Sumário

1. Introdução.....	8
2.1. A retração de geleiras Antárticas	10
2.2. Fungos basidiomicetos na Antártica	12
2.3. Poluentes ambientais.....	14
2.3.1 Corantes têxteis	14
2.3.2 Óleo diesel.....	17
2.4 Biorremediação de poluentes ambientais	18
3. Objetivos	22
3.1. Objetivos específicos	22
4. Material e métodos	23
4.1. Micro-organismos	23
4.2. Caracterização taxonômica dos basidiomicetos.....	24
4.2.1. Extração e amplificação de DNA.....	24
4.2.2. Purificação e sequenciamento	25
4.2.3. Montagem dos contigs e análises das sequências	26
4.3. Biodegradação do corante Vermelho Congo	26
4.3.1. Atividade enzimática	27
4.3.2. Análise da fitotoxicidade com <i>Cucumis sativus</i>	28
4.3.3. Descoloração do corante Vermelho Congo	28
4.3.4. Adsorção do corante Vermelho Congo	29
4.3.5. Determinação da biomassa	29
4.4. Cinética da descoloração.....	30
4.5. Análise de metabólitos por Cromatografia Gasosa associada a Espectrômetro de Massa (GC-MS).....	30
4.5.1. Extração dos metabólitos da degradação do Vermelho Congo.....	30
4.5.2. Análise de GC-MS dos metabólitos da degradação do corante Vermelho Congo	31
4.6. Análise de crescimento na presença do óleo diesel	31
4.7. Análises Estatísticas.....	31
5. Resultados e Discussão.....	32
5.1. Caracterização taxonômica dos fungos basidiomicetos de origem Antártica.....	32
5.2. Biodegradação do corante Vermelho Congo	35
5.2.1. Descoloração e toxicidade	35
5.2.2. Atividade enzimática	39
5.2.3. Biomassa.....	42

5.3. Adsorção	43
5.4. Metabólitos de degradação GC-MS.....	46
5.5. Capacidade de crescimento na presença de óleo diesel	54
6. Conclusões.....	57
Referências bibliográficas	59
ANEXO A – Árvore filogenética para o isolado 58 com a região ITS.....	70
ANEXO B - Árvore filogenética para o isolado 58 com a região LSU.....	71
ANEXO C - Árvore filogenética para o isolado 177 com a região ITS.	72
ANEXO D - Árvore filogenética para o isolado 177 com a região LSU.....	73
ANEXO E - Árvore filogenética para o isolado 177 com a <i>supermatrix</i> de ITS e LSU.	74
ANEXO F - Árvore filogenética para os isolados 320 e 344 com a região ITS.....	75
ANEXO G - Árvore filogenética para os isolados 320 e 344 com o gene <i>RPB2</i>.	76
ANEXO H - Árvore filogenética para os isolados 320 e 344 com a <i>supermatrix</i> ITS e <i>RPB2</i>.....	77

1. Introdução

O continente antártico possui condições ambientais extremas que promovem uma pressão seletiva fazendo com que os organismos desenvolvam adaptações que os tornem capazes de sobreviver às condições adversas deste ambiente. Devido às mudanças climáticas que vêm afetando o globo, as geleiras da Antártica estão sofrendo um processo de retração e esse processo propicia um ambiente novo para os micro-organismos se instalarem, o solo recém-descoberto.

Além das mudanças climáticas, o ambiente também está sendo afetado por compostos poluentes liberados na atmosfera, bem como pelas fontes poluidoras de cursos d'água, tais como vazamentos de petróleo e derivados (e.g. óleo diesel) e os efluentes industriais, com enfoque nos da indústria têxtil, que despeja corantes recalcitrantes e tóxicos na natureza.

A indústria têxtil possui grande importância econômica, cujo crescimento foi registrado mesmo durante a pandemia da Covid-19. Entretanto, concomitantemente com o crescimento econômico, há o aumento dos resíduos produzidos por essas indústrias e, principalmente, a quantidade de resíduo que não recebe um correto tratamento antes de ser descartado. Estima-se que 80% do volume de água utilizado na produção têxtil seja descartado em forma de efluente têxtil, contendo diversos compostos tóxicos, como corantes, metais pesados e compostos clorados (LEÃO, 2002; CHEQUER *et al.*, 2013; MADHAV *et al.*, 2018; WORLD TRADE ORGANIZATION, 2021). Dentre esses compostos, são especialmente preocupantes os corantes, pois causam a mudança de cor dos corpos d'água, dificultando a passagem de luz e, conseqüentemente, afetando os organismos que ali vivem. Além disso esses compostos são tóxicos e, não havendo o correto tratamento, podem produzir intermediários ainda mais tóxicos. Dentre os corantes têxteis, a classe dos corantes azo é atualmente a mais utilizada, sendo também uma das mais tóxicas, com efeitos carcinogênicos em humanos (CHEQUER *et al.*, 2013).

Quanto aos derivados do petróleo, o óleo diesel, além de contribuir com a poluição do ar, também contamina o solo, podendo chegar ao lençol freático, em casos de vazamento e rompimentos de oleodutos, e ao mar, em casos de acidentes navais. O óleo diesel quando chega ao solo pode afetar a nitrificação, levando a prejuízos ao desenvolvimento de plantas. Para humanos, a exposição prolongada a esse poluente pode

causar efeitos agudos, com comprometimento neurológico (DIÓGENES, 2014; ABDULRASHEED *et al.*, 2020; LIM *et al.*, 2021).

Devido ao potencial enzimático dos fungos basidiomicetos, eles são considerados uma alternativa ecológica para a biorremediação de poluentes ambientais. As enzimas ligninolíticas produzidas por esse grupo de fungos, originalmente para clivar a molécula de lignina, podem atuar em moléculas de corantes azo e óleo diesel devido a presença de diversos anéis aromáticos similares aos encontrados na lignina (KUMAR & SHANDRA, 2020; GIOVANELLA *et al.*, 2020).

O grupo de pesquisa liderado pela Profa. Dra. Lara D. Sette tem desenvolvido estudos envolvendo isolamento, preservação, seleção e identificação taxonômica de micro-organismos derivados de ambientes antárticos, visando obtenção de enzimas com aplicação biotecnológica na área industrial e ambiental. Os resultados desses estudos vêm demonstrando o potencial biotecnológico de fungos recuperados a partir de amostras da Antártica e têm estimulado a continuidade e o desenvolvimento de novos projetos.

O presente trabalho é parte do projeto intitulado “Micologia Antártica: Diversidade e Aplicação Biotecnológica” (CNPq nº407986/2018-9) e teve como objetivo conhecer a identidade taxonômica de quatro fungos basidiomicetos recuperados de amostras de solo de recuo da geleira Collins (Península Fields, Antártica) e depositados na Coleção de Recursos Microbianos da Unesp (CRM Unesp), bem como verificar a produção de enzimas ligninolíticas por esses fungos e avaliar o seu potencial uso na biorremediação de corantes têxteis e óleo diesel.

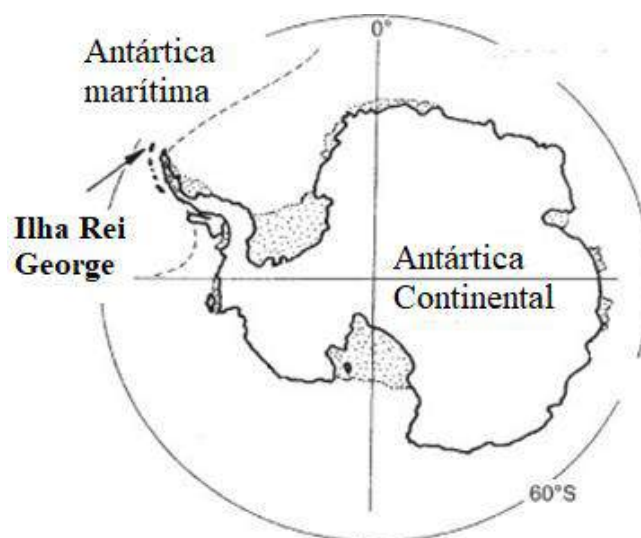
2. Revisão bibliográfica

2.1. A retração de geleiras Antárticas

O continente antártico encontra-se isolado dos demais continentes por correntes oceanográficas e pela distância, sendo caracterizado por extremos de clima, habitats e biogeografia. Os ecossistemas antárticos apresentam algumas características marcantes como o ar seco, escassez de nutrientes no solo, alta taxa de ventos, altos índices de radiação ultravioleta e baixas temperaturas, que limitam a diversidade de vida no local (TURNER *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2020).

A Antártica é dividida ecologicamente em três regiões principais: a Antártica continental, a Antártica marítima e a zona subantártica (Figura 1).

Figura 1. As três regiões da Antártica: Antártica Continental, Antártica Marítima e Zona Subantártica, com destaque para a Ilha de Rei George, localizada no arquipélago das Shetland do Sul. A linha tracejada representa a divisória entre a Antártica Continental e a Antártica Marítima. A Zona Subantártica é representada pelas áreas de oceano, excluindo-se a pequena região da Antártica Marítima. Fonte: adaptado de Bölter, Beyer & Stonehouse, 2002.



A Antártica continental é a que apresenta as maiores altitudes e as menores temperaturas já registradas na Terra, com condições extremas demais para sustentar uma grande diversidade de vida. A zona subAntártica é representada pelas ilhas mais dispersas no oceano, onde o inverno é menos rígido. Por fim, a região marítima é aquela que abrange a península Antártica e ilhas vizinhas, incluindo o arquipélago das Ilhas Shetland

do Sul, possui clima mais ameno do que o apresentado na região continental, com mais chuvas (BÖLTER, BEYER & STONEHOUSE, 2002).

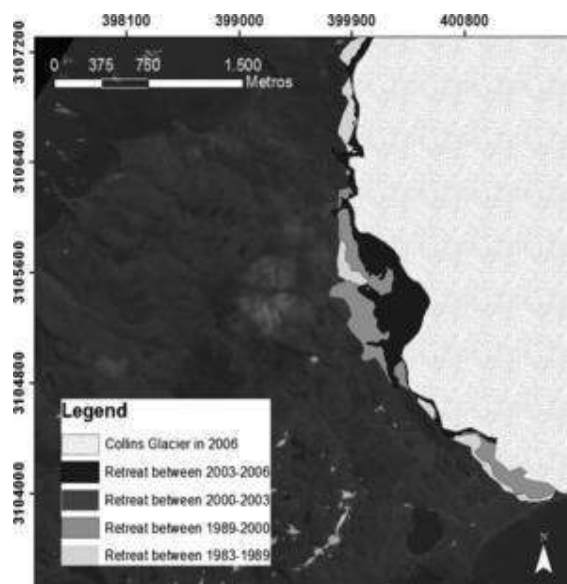
A maior parte do território antártico, 98% da Antártica Continental e entre 60-80% da Antártica marítima, é composta de um ambiente virtualmente estéril devido à cobertura de gelo, que dá suporte a grupos limitados de organismos vivos. No entanto, esse cenário tem mudado nas regiões com retração de gelo (BÖLTER, BEYER & STONEHOUSE, 2002; PETSCH *et al.*; 2020). No geral, a Antártica tem suportado bem as mudanças climáticas resultantes do aquecimento global. Essa resistência é devido ao buraco na camada de ozônio existente nessa região, formado após níveis massivos de emissão de gases clorofluorcarbonos (CFCs), que reagiram com as moléculas de ozônio, levando a um afinamento dessa camada acima da região Antártica (SIVASAKTHIVEL & REDDY, 2010). A camada de ozônio da estratosfera absorve o calor irradiado de camadas mais baixas da atmosfera, sendo assim, uma camada mais fina absorve menos, possibilitando um maior escape de calor direto para o espaço (TURNER *et al.*, 2009; ADEOYE & AINA, 2019). Por outro lado, a Península Antártica é um caso a parte: ventos oeste, úmidos e quentes, vindos do oceano e rápidas sucessões de sistemas de baixa pressão estão fazendo com que os verões nessa região sejam cada vez mais quentes (KNAP, OERLEMANS & CADÉE, 1996; XU *et al.*, 2021).

Na Península Antártica está presente o arquipélago das Ilhas Shetland do Sul, sendo uma das suas ilhas a Ilha Rei George. Devido às mudanças climáticas e ao gradual aumento da temperatura, que chegou a mais de 3 °C em seis anos, as geleiras dessa área estão passando por um processo de retração, em especial a geleira Collins (SIMÕES *et al.*, 2015;).

A geleira Collins está localizada na Península Fields (Ilha Rei George) e é uma pequena cúpula de gelo centrado com uma área de 15 km², o que a torna muito suscetível a variações climáticas (TURNER *et al.*, 2009). O estudo de Simões *et al.* (2015) revelou a perda de aproximadamente 8,42% de área no período de 1983 a 2012, em um processo gradual ao longo das décadas (Figura 2). Em previsões feitas por Petsch *et al.* (2020), é esperado que até 2030, mais 5% dessa cobertura de gelo seja perdida, chegando a um total de 35% até 2070. Os resultados obtidos são explicados pela combinação de uma área com menor espessura de gelo e maior exposição à radiação solar, além de outros fatores que afetam a Península Antártica no geral. Ao contrário das outras regiões que ainda estão

cobertas por gelo, o estabelecimento de novas camadas de solo nessas regiões onde há retração permite o aparecimento de vida microbiana.

Figura 2. Retração da geleira Collins, de 1983 até 2006. Fonte: Simões *et al.*, 2015.



Os fungos são considerados um dos primeiros colonizadores do solo recém exposto e possuem papel crucial na formação de solo fértil que sustentará o crescimento e o desenvolvimento da comunidade vegetal (FIERER *et al.*, 2010; BRADLEY, SINGARAYER & ANESIO, 2014). Assim, além da relevância do estudo da biodiversidade do solo de recuo de geleira para que as futuras alterações decorrentes do descongelamento possam ser monitoradas, os micro-organismos que ali se estabelecem podem ser considerados potenciais novas fontes de recursos genéticos para aplicação biotecnológica.

2.2. Fungos basidiomicetos na Antártica

A vida microbiana no solo da região Antártica é tolerante a diversos estresses como a dessecação, altos teores de sal, radiação solar e temperaturas baixíssimas, resultado do desenvolvimento de estratégias funcionais, como a produção de enzimas adaptadas ao frio e compostos bioativos (DUARTE *et al.*, 2018; ROSA *et al.*, 2019; VACA & CHÁVEZ, 2019).

Os micro-organismos antárticos podem ser classificados como psicrófilos, psicrotróficos (psicrotolerantes) ou mesofílicos-psicrotolerantes. Tanto os psicrófilos

quanto os psicrotróficos são capazes de crescer a 0 °C. Entretanto, os psicrotróficos apresentam crescimento em temperaturas acima de 20 °C, enquanto os psicrófilos não crescem em temperaturas superiores a 20 °C. Para os psicrotróficos, a temperatura ótima de crescimento é menor do que 15 °C, enquanto para os psicrotróficos essa temperatura pode variar de 15 °C a 25 °C (RUISI *et al.*, 2007; BARGHINI, *et al.*, 2018). Os mesófilos-psicrotolerantes são aqueles micro-organismos que suportam temperaturas baixas, mas que não chegam a 0 °C e as temperaturas máximas de crescimento podem ultrapassar os 40 °C (ROBINSON, 2001). A maioria dos micro-organismos recuperados de amostras da região da península são psicrotolerantes (RUISI *et al.*, 2007) e essa predominância pode ser explicada pelo fato de que em alguns períodos do ano a temperatura do solo pode chegar a 15 °C (MÖLLER e DREYFUSS, 1996; HRBÁČEK *et al.*, 2020).

Dentre os diversos filos de fungos filamentosos conhecidos, representantes do filo Basidiomycota são raramente isolados de amostras da Antártica. Em um dos primeiros levantamentos feitos por Pegler, Spooner & Smith (1980) sobre a diversidade de fungos presentes na Antártica, a predominância de basidiomicetos já se mostrou bem abaixo da observada para os ascomicetos. Em estudos mais recentes, a frequência e abundância de unidades formadoras de colônia de basidiomicetos em amostras da Antártica mostraram-se baixas (ARENZ & BLANCHETTE, 2019), podendo chegar a apenas 10% dos isolamentos (DURÁN *et al.*, 2019). Porém, estudos recentes do nosso grupo de pesquisa utilizando abordagem independente de cultivo (*metabarcoding*) revelaram que os fungos basidiomicetos são dominantes nos solos de recuo de geleiras Antárticas. Por esta abordagem, um total de 19 gêneros foi encontrado nas amostras de solos do recuo da geleira Collins, sendo os gêneros *Verrucaria*, *Mortierella* e *Peniophora* os de alta abundância e prevalência em todas as amostras (SANTOS *et al.*, 2020).

A dificuldade de isolamento de fungos basidiomicetos na Antártica (SANTOS *et al.*, 2020) demonstra a relevância do estudo dos quatro fungos isolados a partir de amostras de solo de recuo da geleira Collins, os quais são componentes da diversidade de um local extremo e podem possuir adaptações importantes a serem conhecidas e biotecnologicamente exploradas.

2.3. Poluentes ambientais

Atualmente, além das mudanças climáticas causadas por poluições na atmosfera citadas anteriormente, o meio ambiente vem enfrentando também condições adversas provenientes da atividade industrial, que ainda é ineficaz no tratamento de resíduos, na contenção e posterior remediação de vazamentos. Há, em especial, dois casos importantes de fontes poluidoras de difícil controle: os efluentes têxteis e os hidrocarbonetos, incluindo o óleo diesel.

2.3.1 Corantes têxteis

A indústria têxtil, globalmente, é uma área de grande importância econômica, fato deixado em evidência ao analisar o crescimento de 16% do setor em um ano crucial para a economia: 2021, ano em que a pandemia de Covid-19 ainda causava danos a diversas outras áreas da indústria. Esse crescimento se deu principalmente pela produção de equipamentos de proteção individual. Atualmente, a China e os países da União Europeia são os maiores exportadores, que juntos arrecadaram no ano de 2020 o valor de US\$ 218 bilhões (World Trade Organization, 2021).

No Brasil, no entanto, houve uma queda no faturamento durante a pandemia da COVID-19, com uma diferença de US\$ 108 milhões em exportações e US\$ 1,1 bilhões em importações entre 2019 e 2020. Mesmo em um ano de refreamento, os valores de produção ainda foram exorbitantes: mais de 9 bilhões de peças foram produzidas, totalizando, em média, mais de 2 milhões de toneladas (IEMI, 2020).

Com uma produção dessa magnitude, consequentemente, a quantidade de resíduos gerados é expressiva. Mundialmente, das mais de 100 milhões de toneladas de produtos têxteis produzidos, menos do que 13 % é reciclado e apenas 1 % reaproveitado em novas roupas (Ellen MacArthur Foundation, 2017). Entretanto, as indústrias têxteis são ainda mais nocivas ao ambiente devido ao elevado volume de água que utilizam. Para produzir cerca de 1 kg de material têxtil são necessários 50 a 100 L de água, com mais de 80 % desse volume sendo descartado em forma de efluente têxtil (LEÃO, 2002; MADHAV *et al.*, 2018). Na fabricação de produtos têxteis são empregados mais de 8.000 compostos químicos, contendo substâncias orgânicas recalcitrantes, surfactantes, compostos clorados, metais pesados e compostos com cor (KANT, 2012; CHEQUER *et al.*, 2013; MADHAV *et al.*, 2018).

Durante a manufatura, a indústria têxtil emprega uma série de processos, todos eles envolvendo produtos químicos que acabam com uma parcela compondo os efluentes têxteis que são descartados sem um tratamento adequado. *Sizing* e *desizing* são as etapas que utilizam ácidos e enzimas que conferem proteção ao material ou retiram compostos que podem interferir nas etapas posteriores; *scouring* é a etapa que corresponde a uma limpeza pesada, utilizando solventes, detergentes, desinfetantes e inseticidas; descoloração, etapa que é opcional, mas quando ocorre, adiciona hipoclorito ao efluente final; mercerização que fortalece as fibras com soda cáustica e prepara o material para receber a última etapa; e, por fim, o tingimento, que utiliza os corantes têxteis junto com outros químicos, como sais e surfactantes, que aumentam o poder de adsorção da fibra (CHEQUER *et al.*, 2013; MADHAV *et al.*, 2018).

Embora todas essas etapas levem componentes tóxicos para o efluente têxtil final, o tingimento, com o uso de corantes têxteis, traz mais complicações que dificultam o tratamento e tornam os impactos ambientais mais preocupantes. Estima-se que cerca de 200 mil toneladas de corantes sejam perdidas no efluente têxtil, o que corresponde a uma parcela de 10 a 50% do total utilizado no tingimento e demonstra o quão ineficiente ainda é o processo e como são necessárias inovações que possam encontrar alternativas que diminuam essa perda (CHEQUER *et al.*, 2013; MADHAV *et al.*, 2018).

Os corantes alteram a coloração da coluna d'água, impedindo a passagem de luz para as camadas inferiores, interferindo na capacidade fotossintetizante de diversos organismos e causando uma limitação na quantidade de oxigênio no fluxo de água (CHEQUER *et al.*, 2013; KHANDEGAR & SAROHA, 2013). Além disso, o despejo de efluentes têxteis com corantes afeta parâmetros de qualidade da água como a demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), pH e salinidade (CHEQUER *et al.*, 2013). Um caso emblemático de descarte incorreto de corantes em cursos d'água aconteceu na China, no Rio Jian, onde, em 2011, uma pequena empresa despejou litros de corante vermelho provenientes do tingimento de bolsas (SHAO, 2011). Embora análises feitas na água não tenham encontrado metais pesados ou compostos orgânicos tóxicos, o caso ilustra bem a mudança de coloração e o consequente impacto à vida aquática.

Corantes são formados basicamente por duas partes fundamentais: o cromóforo e o auxocromo. O cromóforo é a porção da molécula responsável por produzir a cor observável. Já o auxocromo é suplementar, aumentando a cor, proporcionando a

solubilidade em água e melhorando a afinidade com a fibra à qual o corante será aplicado, podendo ser ácido ou básico. Qualquer outra adição à molécula compõe a matriz molecular (SAMSAMI *et al.*, 2020; BENKHAYA, M'RABET & HARFI, 2020).

A classificação dos corantes é complexa e pode ser dividida em duas categorias: estrutura do cromóforo e modo de aplicação. Quanto à estrutura do cromóforo, algumas classificações possíveis são: nitro ($-\text{NO}_2$), azo ($-\text{N}=\text{N}-$), nitroso ($-\text{N}=\text{O}$), tiocetona ($-\text{C}=\text{S}$), carbonila ($-\text{C}=\text{O}$) e alquenos ($-\text{C}=\text{C}-$). Quanto ao método de aplicação, podemos classificar os corantes como: ácido, básico, disperso, direto, reativo, sulfuroso e vat. O que varia em cada uma dessas classificações (quanto ao método) é a solubilidade e em quais meios é aplicado. Os corantes costumam ter uma classificação dupla, incluindo o método e a estrutura do cromóforo (VENTURA-CAMARGO & MARIN-MORALES, 2013; SAMSAMI *et al.*, 2020; BENKHAYA, M'RABET & HARFI, 2020).

Dentro dessas classificações, uma das classes mais preocupantes é a dos corantes azo. Atualmente, os corantes azo são os mais produzidos e os mais utilizados, devido a seu baixo custo e boa fixação: correspondem a 70 % da produção anual mundial de corantes sintéticos. Cerca de 60 % dos corantes azo são considerados tóxicos e carcinogênicos na sua forma original, com o agravante de que quando suas moléculas são clivadas parcialmente, podem originar compostos, que muitas vezes apresentam maior toxicidade do que a molécula original. Em humanos, enzimas produzidas no fígado podem fazer a clivagem das ligações azo, gerando aminas tão perigosas que podem causar danos ao DNA (CHEQUER *et al.*, 2013). O problema é tão grave que em alguns países como Alemanha, Suíça, França e Dinamarca foram elaboradas legislações específicas para lidar com a produção e o consumo desses corantes, principalmente na indústria têxtil (VENTURA-CAMARGO & MARIN-MORALES, 2013; BENKHAYA, M'RABET & HARFI, 2020).

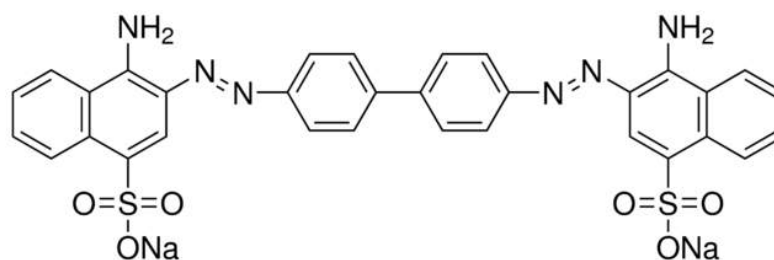
2.3.1.1 Vermelho Congo

O Vermelho Congo é um corante diazo ($-\text{N}=\text{N}-$) (Figura 3), muito utilizado industrialmente, em produtos têxteis e plásticos, por exemplo, e também como corante de células vivas com propósito de aplicações biológicas, como detector de bactérias. Foi criado pelo químico Paul Böttiger na tentativa de sintetizar um novo indicador de pH, mas que obteve como resultado um corante de cor vermelho vivo, que surgiu com uma inovação: ao ser utilizado na indústria têxtil não requeria uma substância mordente para

fixar nas fibras de tecido, dando início a classe de corantes diretos (STEENSMA, 2001; YANEVA & GEORGIEVA, 2012).

Entretanto, o corante Vermelho Congo possui toxicidade comprovada, sendo citotóxico, neurotóxico, mutagênico e carcinogênico. Além disso, quando degradado gera formas de aminas, em especial a benzidina, um preocupante composto carcinogênico para humanos (YANEVA & GEORGIEVA, 2012; BENKHAYA, M'RABET & HARFI, 2020; ZHENG *et al.*, 2021).

Figura 3 - Estrutura química do corante Vermelho Congo. Fonte: Sigma-Aldrich.



2.3.2 Óleo diesel

O óleo diesel é um complexo de hidrocarbonetos, incluindo alcanos e aromáticos policíclicos, podendo também conter enxofre, nitrogênio, oxigênio e metais em menores concentrações. Contém uma média de 3000 hidrocarbonetos, nas seguintes proporções: 64% alifáticos, 35% aromáticos e 1-2% olefínicos. Entre esses hidrocarbonetos, quatro classes estruturais são mais comumente encontradas: n-alcanos e n-parafinas, nos lineares saturados; isoalcanos e isoparafinas, nos ramificados saturados; cicloalcanos e naftalenos, nos alcanos cíclicos saturados; e, por fim, os aromáticos (AHMED & FAKHRUDDIN, 2018).

Dentro dessas classes estruturais, há uma hierarquia quanto a toxicidade, sendo os hidrocarbonetos lineares os menos tóxicos e os aromáticos os mais. Os compostos aromáticos presentes no diesel são mais comumente conhecidos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), podendo conter de dois a seis anéis aromáticos na sua formação. Os HPA são tóxicos, carcinogênicos e mutagênicos, o que torna perigosa a degradação incompleta do diesel no ambiente, levando-se em conta a grande quantidade dessas moléculas presentes na molécula integral de diesel (IMRON *et al.*, 2020).

O óleo diesel, além de ser um contribuinte direto na poluição do ar, através da queima dos motores de automóveis, também é capaz de contaminar o solo podendo chegar às águas do lençol freático, em casos de vazamento e rompimentos de oleodutos, como o ocorrido em Mato Grosso do Sul após um descarrilhamento, em abril de 2013, que contaminou o Córrego da Ponta e infiltrou o solo (DIÓGENES, 2014). Também há casos de acidentes navais que deixam longas manchas de óleo no mar, como no acidente que ocorreu com o navio Clelia II, na passagem de Drake na Antártica em 2009, que permitiu o vazamento de cerca de 210 mil litros de óleo (LIM *et al.*, 2021).

A Antártica é um local especialmente afetado por acidentes envolvendo óleo diesel, por ser este o produto proveniente do petróleo mais utilizado no local. Esses acidentes levam a mudanças na comunidade microbiana que habitam a porção descongelada do solo. As condições naturalmente adversas do continente antártico dificultam ainda mais os processos naturais de degradação biótica e abiótica que poderiam diminuir a toxicidade do óleo diesel derramado (ABDULRASHEED *et al.*, 2020).

Entre os hidrocarbonetos provenientes do petróleo, o óleo diesel é o que possui o maior efeito sobre a nitrificação no solo que polui, podendo causar efeitos crônicos e agudos nas plantas, incluindo desde a diminuição na taxa de germinação e crescimento das plantas, até a inibição completa do desenvolvimento (ABDULRASHEED *et al.*, 2020). Efeitos agudos provenientes de exposição prolongada ao óleo diesel também são registrados em humanos, podendo variar de dores de cabeça e pneumonia quando inalado até efeitos neurotóxicos e nefrotóxicos, chegando à falha dos rins. Embora ainda não tenha registro de efeitos crônicos em humanos, já foi reportada atividade carcinogênica em outros animais (ABDULRASHEED *et al.*, 2020).

2.4 Biorremediação de poluentes ambientais

Ao ocorrer um acidente ambiental com despejo de produtos xenobióticos, como corantes têxteis e óleo diesel, o próprio microbioma local começa um processo de atenuação natural, que consiste na redução da massa, volume, concentração, mobilidade e toxicidade dos contaminantes, sem ser necessária intervenção humana (LIM *et al.*, 2021). Entretanto, como os micro-organismos ali presentes não estão adaptados à presença destas substâncias, poucos serão capazes de sobreviver, o que torna todo esse processo natural muito longo. Por isso é necessária a intervenção humana no momento em que acidentes como esses ocorrem.

Existem três intervenções possíveis quando se trata de controle de acidentes ambientais com derramamento de poluentes: físico, químico e biológico. O controle físico consiste basicamente em métodos de contenção e recuperação, que servem para prevenir que a contaminação tome proporções maiores. Em casos de derramamento de óleo em alto mar, queimar a mancha de óleo pode ser uma maneira de controle físico que chega a remover cerca de 98% do poluente, caso seja feito em tempo hábil (LIM *et al.*, 2021).

A remediação química requer o uso de produtos químicos, como dispersantes e surfactantes, capazes de quebrar manchas de óleo, ou químicos precipitantes, que convertem substâncias solúveis em suas formas insolúveis, tornando mais fácil o resgate mecânico dos poluentes. Entretanto, o uso de mais produtos químicos em um local que já está saturado com substâncias xenobióticas pode ser prejudicial para os diferentes tipos de organismos que ali habitam (LIM *et al.*, 2021; SINGH *et al.*, 2022).

O método mais indicado e ambientalmente mais benéfico é o biológico, alvo de diversos estudos. A biorremediação, como ficou conhecida essa abordagem, consiste na utilização de transformações biológicas, muitas vezes por meio do uso de micro-organismos, visando a completa mineralização, ou, no mínimo, a diminuição da toxicidade dos poluentes originais. Pode ser feita por dois métodos: a degradação ou a adsorção. A degradação utiliza organismos vivos e enzimas por eles produzidas para quebrar as moléculas do poluente ou utilizá-lo como fonte de carbono. Já a adsorção é um método passivo, em que a remoção do poluente é feita pela capacidade adsorvente do material biológico pelo organismo (SINGH *et al.*, 2022).

A degradação de poluentes ambientais por fungos basidiomicetos ocorre por meio da produção de enzimas ligninolíticas e/ou pelo sistema do citocromo P450 e epóxido hidrolases (HATTAKA, 1994; WEIJERS & BONT, 1999; ICHINOSE, 2013).

O complexo enzimático do citocromo P450 é encontrado nos três domínios da vida (Eukarya, Bacteria e Archaea) e é formado por monoxigenases capazes de oxidar diversos substratos, incluindo hidrocarbonetos e compostos com aminas, através do uso do oxigênio molecular (BEHRENDORFF, 2021). As enzimas desse complexo produzidas por fungos, incluindo os basidiomicetos, já são utilizadas pela indústria no processo de oxidação de contaminantes antes de seu descarte, estando envolvidas em processos complexos como hidroxilação alifática, epoxidação, desalquilação,

desalogenação e diversos tipos de inativação (SHARMA, DANGI & SHUKLA, 2018; BANDHARI *et al.*, 2021; WANG *et al.*; 2021).

Mais de 14000 espécies de fungos que expressam enzimas ligninolíticas já foram registradas, as quais possuem como alvo a lignina, uma biomolécula complexa, abundante na natureza e de difícil biodegradação (KUMAR & SHANDRA, 2020). Como a molécula de lignina é composta por diversos fenóis aromáticos, compostos xenobióticos com uma composição levemente parecida podem servir de substrato para essas enzimas. O processo pelo qual as enzimas ligninolíticas atuam tem uma grande amplitude de ação: podem promover a hidroxilação, oxidação, redução e metilação na quebra de compostos orgânicos (GIOVANELLA *et al.*, 2020).

Dentre as enzimas ligninolíticas, as lacases desempenham papel importante no processo degradativo e são as melhores estudadas até então. Essas enzimas contêm cobre em seus sítios ativos e são capazes de catalisar a oxidação de diversos compostos orgânicos e inorgânicos, incluindo substâncias recalcitrantes (NOVOTNÝ *et al.*, 2004; MADHAVI & LELE, 2009). Atualmente são conhecidas diversas aplicações para lacases provenientes de fungos basidiomicetos: no processamento de polpa de papel e de alimentos, biorremediação e biodegradação de uma ampla gama de compostos tóxicos, que contaminam o solo e a água, produção de bioetanol de segunda geração, entre outras (SHRADDHA *et al.*, 2011; PLÁCIDO & CAPAREDA, 2015; IARK *et al.*, 2019; BILAL & IQBAL, 2019; BILAL *et al.*, 2019). O amplo espectro de atuação e aplicação dessa enzima demonstra o quão versátil ela pode ser, sendo os estudos sobre ela passíveis de descobrimento de inovações biotecnológicas.

Atualmente, micro-organismos vêm sendo utilizados como uma alternativa mais ecológica, sustentável e de baixo custo para fazer o tratamento de poluentes, como os corantes têxteis e o óleo diesel. Diversos trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa vêm demonstrando o potencial de fungos basidiomicetos de origem marinha para a descoloração e diminuição da toxicidade de corantes e efluentes têxteis (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2016; BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2015; BONUGLI-SANTOS, DURRANT & SETTE, 2012). Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, como os encontrados no óleo diesel, também foram biodegradados com sucesso por basidiomicetos marinhos (VIEIRA *et al.*, 2018; PASSARINI *et al.*, 2011). Quanto aos basidiomicetos antárticos, ainda há um grande campo a ser explorado.

Considerando o acima exposto, acreditamos que o estudo dos basidiomicetos antárticos provenientes de solos de recuo de geleira é inovador e poderá resultar na descoberta de novas fontes de recursos microbianos para aplicação ambiental (biorremediação), já que pouco se tem registrado na literatura sobre suas capacidades.

3. Objetivos

Aprofundar a identificação molecular de quatro fungos basidiomicetos isolados de solo de recuo da geleira Collins, bem como avaliar o potencial destes micro-organismos nos processos de biodegradação e adsorção de poluentes ambientais.

3.1. Objetivos específicos

- ✓ Utilizar novos marcadores moleculares para avançar na identificação preliminar dos quatro basidiomicetos antárticos provenientes de solo de recuo de geleira;
- ✓ Avaliar a capacidade de produção de enzimas ligninolíticas pelos basidiomicetos antárticos;
- ✓ Analisar a capacidade de descoloração, adsorção e destoxificação do azocorante Vermelho Congo pelos fungos basidiomicetos antárticos;
- ✓ Identificar os metabólitos gerados durante o processo de biodegradação do corante Vermelho Congo pelos fungos selecionados, utilizando cromatografia gasosa associada a espectrômetro de massa (GC-MS).
- ✓ Investigar a capacidade de crescimento dos fungos basidiomicetos antárticos na presença de óleo diesel.

4. Material e métodos

4.1. Micro-organismos

Foram utilizados quatro fungos basidiomicetos (Figura 4) isolados de amostras de solo de recuo da Geleira Collins (Ilha Rei George, Antártica) e preliminarmente identificados de acordo com SANTOS *et al.* (2020) utilizando apenas a região ITS (Tabela 1). As amostras foram coletadas pela Dra. Emanuele Kuhn em fevereiro de 2015, durante a fase IV da OPERANTAR XXXIII. Os fungos foram isolados de acordo com Santos *et al.* (2020) e estão depositados na coleção de culturas do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial (LAMAI), a qual é associada à Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP). O cultivo dos fungos foi feito em meio Ágar Batata Dextrose (PDA), em incubadora BOD a 25 °C.

Figura 4 - Fungos basidiomicetos isolados de amostras de solo de recuo da Geleira Collins (Ilha Rei George, Antártica). A1 e B1: B9.320 *Pholiota* sp.; A2 e B2: P4.177 Russulales; A3 e B3: P3.58 *Schizophyllum* sp.; A4 e B4: B9.344 *Pholiota* sp. Fonte: a autora.

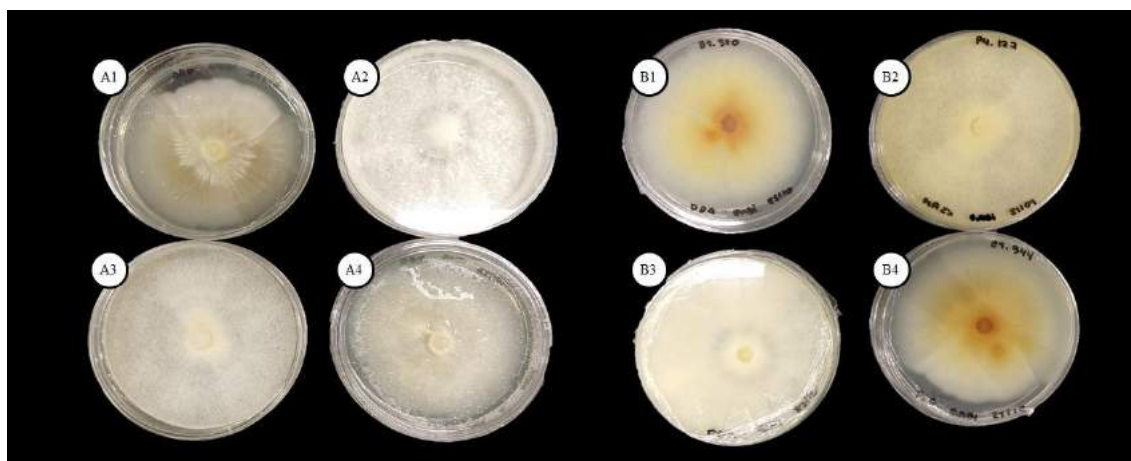


Tabela 1. Identificação preliminar e distância de coleta da amostra de origem dos fungos basidiomicetos estudados (SANTOS, 2020).

Código	Distância da geleira (m)	Identificação (marcador ITS)
P3.58	100	<i>Schizophyllum</i> sp.
P4.177	150	Russulales
B9.320	400	<i>Pholiota</i> sp.
B9.344	400	<i>Pholiota</i> sp.

4.2. Caracterização taxonômica dos basidiomicetos

4.2.1. Extração e amplificação de DNA

Para o aprofundamento da identificação preliminar dos quatro basidiomicetos estudados (Tabela 1) no presente trabalho, novas regiões e marcadores moleculares foram utilizados (Tabela 2). A extração de DNA foi realizada pelo método de Gerardo *et al.* (2004) e Möller *et al.* (1992) com modificações. Método baseado na lise química com tampão de lise e, posteriormente, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (tampão de lise composto por Tris 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 250 mM, SDS 0,3 %, pH 8,0 e esterilizado por filtração) e lise mecânica com auxílio de esferas de vidro *glass beads* (Sigma). Foi então realizada precipitação do DNA com isoprpanol absoluto, seguido de lavagem com etanol 100% e 70%. O material foi suspenso em 50 µL de tampão.

Tabela 2. Seleção de *primers* para identificação dos fungos basidiomicetos estudados.

Grupo	Regiões	Primers	Referência
<i>Schizophyllum</i>	ITS	ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTTGCGG-3')	Chowdhary <i>et al.</i> (2013b)
		ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')	
	D1/D2	NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3')	
		NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')	
<i>Pholiota</i>	ITS	ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')	Matheny <i>et al.</i> (2018)
		ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')	
	RPB2	PhRPB2-6F (5'-GCCGAAACCCAGAAGGTCAAGC-3')	
		PhRPB2-7R (5'-CTGGTTATGATCTGGAAGGG-3')	
	ITS	ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')	
		ITS4-B (5'-CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG-3')	

Russulales	LSU	LROR (5'-TACCCGCTGAACTTAAGC-3')	Das <i>et al.</i> (2014)
		LR7 (TACTACCACCAAGATCT)	Miller <i>et al.</i> (2001)

A amplificação foi realizada em termociclador seguindo as condições descritas na Tabela 3. Para verificação da obtenção dos *amplicons* foi realizada eletroforese em gel de agarose 1 % com aplicação de 70 V por 40 min.

Tabela 3. Condições dos ciclos do termociclador para cada fungo basidiomiceto e seus distintos primers.

Grupo	Regiões	Ciclos
<i>Schizophyllum</i>	ITS	Desnaturação inicial de 95 °C por 3 min
		36 ciclos de 94 °C por 1 min/52 °C por 30 s/ 72 °C por 2 min
		Elongação final de 72 °C por 10 min
	D1/D2	Desnaturação inicial de 95 °C por 3 min
		30 ciclos de 94 °C por 1 min/52 °C por 30 s/ 72 °C por 2 min
		Elongação final de 72 °C por 10 min
<i>Pholiota</i>	ITS	Desnaturação inicial de 95 °C por 3 min
		36 ciclos de 94 °C por 1 min/52 °C por 30 s/ 72 °C por 2 min
		Elongação final de 72 °C por 10 min
	RPB2	Desnaturação inicial de 95 °C por 5 min
		30 ciclos de 95 °C por 1 min/55 °C por 2 min/ 72 °C por 2 min
		Elongação final de 72 °C por 10 min
Russulales	ITS	Desnaturação inicial de 94 °C por 3 min
		35 ciclos de 94 °C por 1 min/55 °C por 1 min/ 72 °C por 2 min
		Elongação final de 72 °C por 10 min
	LSU	Desnaturação inicial de 95 °C por 5 min
		30 ciclos de 95 °C por 1 min/55 °C por 2 min/ 72 °C por 2 min
		Elongação final de 72 °C por 7 min

4.2.2. Purificação e sequenciamento

A purificação dos *amplicons* foi realizada com as enzimas exonuclease1 e fosfatase alcalina (Thermo Scientific, Estados Unidos) (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2010) e com o kit *PureLink™ Quick PCR Purification Kit* da Invitrogen. Todos os produtos de PCR tiveram suas concentrações padronizadas em 50 ng/μL e foram então encaminhados

para empresa terceirizada para o sequenciamento de Sanger (ABI3130 DNA Analyser – Applied Biosystems).

4.2.3. Montagem dos contigs e análises das sequências

Os contigs foram gerados com o software *Bioedit Sequence Alignment Editor* (Versão 7.0.5.3). Com os contigs prontos, as sequências foram comparadas com o banco de dados do *Nation Center for Biotechnology Information* (NCBI) com o auxílio da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Após a seleção de sequências relevantes, o alinhamento foi feito com o MUSCLE (*multiple comparison by logexpectation*) e editadas manualmente no software MEGA-X (Versão 10.2.6).

Para a seleção do melhor modelo de substituição de DNA de acordo com as informações Akaike foi utilizado o PAUP* 4.0 (SWOFFORD, 2003). A análise filogenética foi feita por Máxima Verossimilhança, com árvore inicial por *Neighbour-Joining*, bootstrap de 1000 réplicas e método heurístico com o algoritmo *Nearest Neighbor Interchange* (NNI).

4.3. Biodegradação do corante Vermelho Congo

A partir do cultivo de 7 dias a 25 °C em meio Agar Batata Dextrose (PDA) foram retirados três cilindros (5 mm de diâmetro) de cada fungo, separadamente, e transferidos para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 20 mL de caldo Batata Dextrose (PDB) para o preparo do pré-inóculo. Os frascos foram incubados a 25 °C sob e 120 rpm por mais 7 dias. A biomassa fúngica foi lavada três vezes com solução salina (NaCl 0,9%) para a completa retirada do meio de cultivo (rico em carbono), transferida para novos frascos Erlenmeyers contendo 50 mL de meio Mínimo Mineral (MM) (Composição em g/L: KCl 0,7; KH₂PO₄ 2; Na₂HPO₄ 3; NH₄NO₃ 1; MgSO₄ 4; FeSO₄ 0,2; MnCl₂ 0,2; CaCl₂ 0,2) suplementado com o corante Vermelho Congo, nas concentrações de 50 e 100 mg/L, por um novo período de 7 dias a 25 °C e 120 rpm, em pH 6. Após o período do ensaio, o conteúdo dos Erlenmeyers foi transferido para tubos tipo Falcon e então centrifugados a 10000 rpm a 4 °C por 15 min, para a separação da biomassa do sobrenadante. Os ensaios foram feitos em triplicatas e para o controle negativo foi utilizado apenas o meio MM com o corante nas duas concentrações testadas (ausência de pré-inóculo).

4.3.1. Atividade enzimática

Para a avaliação da atividade enzimática, foi utilizado o sobrenadante obtido no item 4.3. A reação foi feita em cubeta de quartzo com capacidade para 1 mL. A determinação da atividade enzimática das três enzimas ligninolíticas (lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase) foi realizada com cálculos a partir da equação 1, derivada da Lei de Lambert-Beer, sendo definida a atividade enzimática (U) como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de substrato por minuto, expressa em U/L.

$$U/L = \Delta A \times V \times 10^6 / \varepsilon \times R \times t$$

Equação 1

Onde:

ΔA = diferença entre a absorbância final e a absorbância inicial;

V = volume da reação (L);

ε = coeficiente de extinção ($\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$);

10^6 = fator de conversão de ε para μ ;

R = quantidade de caldo enzimático (L);

t = tempo de reação (min).

4.3.1.1 Lacase

A atividade enzimática para lacase foi avaliada com a utilização do substrato 2,2-azino-bisethylbenthiazolina (ABTS) à 37 °C de acordo com a metodologia descrita por Buswell, Cai & Chang (1995). A reação enzimática foi constituída por 0,3 mL de tampão acetato de sódio (pH 5.0; 0,1 M), 0,1 mL de ABTS (0.03 %) (w/v) e 0,6 mL do caldo enzimático. A oxidação do ABTS foi monitorada pelo aumento da absorbância a 420 nm ($\varepsilon_{420} = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) após 10 min de reação.

4.3.1.2 Lignina peroxidase

A atividade enzimática para lignina peroxidase foi avaliada com a utilização do substrato álcool veratrílico na temperatura ambiente (22 °C). A reação enzimática foi constituída por 0,2 mL de tampão acetato de sódio com álcool veratrílico a 10 mM, 0,2 mL de peróxido de hidrogênio 2mM e 0,6 mL do caldo enzimático. A oxidação do álcool veratrílico foi monitorada pelo aumento da absorbância a 310 nm ($\varepsilon_{310} = 9300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) após 10 min de reação. Adaptado de Arora & Gill (2001).

4.3.1.3 Manganês peroxidase

A atividade enzimática para manganês peroxidase foi avaliada com a utilização do malonato de sódio como substrato na temperatura ambiente (22 °C). A reação enzimática foi constituída por 50 µL de peróxido de hidrogênio 2 mM, 0,8 mL de tampão malonato de sódio 60 mM (pH 4,5), 50 µL de sulfato de manganês 10 mM e 0,1 de caldo enzimático. A oxidação do malonato de sódio foi monitorada pelo aumento da absorbância a 270 nm ($\epsilon_{270} = 11590 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) após 5 min de reação. Adaptado de Wariishi, Valli & Gold (1992).

4.3.2. Análise da fitotoxicidade com *Cucumis sativus*

Para testar a toxicidade dos bioensaios com corante Vermelho Congo (50 e 100 mg/L) após os tratamentos foram utilizadas sementes de pepino (*Cucumis sativus*) cultivadas em placas de Petri, com base nos estudos de Wang *et al.* (2001), com modificações. Em cada uma das placas foram colocadas 15 sementes livres de agrotóxicos e 5 mL de cada bioensaio. Após o preparo, as placas foram envoltas em filme plástico, para evitar a evaporação, e acondicionadas em BOD a 24 °C ao abrigo de luz, por 5 dias. Como controle positivo foi utilizada a solução de ZnSO₄ (0,05 M) e o controle negativo, água destilada. Ao final do período de exposição, as raízes e os hipocótilos foram medidos. Para calcular a taxa de inibição de crescimento foi utilizada a equação 2:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(\text{média do controle negativo} - \text{média do bioensaio})}{(\text{média do controle negativo})}$$

Equação 2

4.3.3. Descoloração do corante Vermelho Congo

A descoloração do corante Vermelho Congo após os tratamentos foi avaliada de acordo com Bonugli-Santos *et al.* (2012). Os tratamentos foram centrifugados a 5000 rpm para separação da biomassa dos sobrenadantes, sendo esses últimos avaliados espectrofotometricamente em amplo espectro (190 nm a 1100 nm). Como controle foi utilizado o meio MM suplementado pelo corante Vermelho Congo, nas duas concentrações estudadas, sem a presença dos fungos. O percentual de descoloração foi avaliado à 534 nm, onde há o pico de absorbância máxima do corante e a taxa de descoloração foi calculada utilizando a equação 3:

$$\% \text{ de descoloração} = \frac{(\text{absorbância inicial} - \text{absorbância final})}{(\text{absorbância inicial})} * 100$$

Equação 3

4.3.4. Adsorção do corante Vermelho Congo

Para verificar a adsorção do corante Vermelho Congo pelo micélio fúngico, foram utilizados 3 cilindros (5 mm de diâmetro) de ágar e micélio do cultivo prévio em meio PDA (7 dias a 25 °C), os quais foram transferidos para Erlenmeyers contendo 20 mL de PDB e incubados a 25 °C com agitação de 120 rpm, por 7 dias. Após esse período, os ensaios foram autoclavados por 40 min a 1 atm para a inativação de possíveis enzimas que pudessem atuar na degradação do corante. O pré-inóculo autoclavado foi transferido para um novo Erlenmeyer contendo 50 mL de meio MM acrescido com o corante Vermelho Congo na concentração de 100 mg/L, seguido de incubação por 7 dias a 120 rpm, nas mesmas condições descritas anteriormente. Após o período de incubação, os ensaios foram centrifugados a 5000 rpm por 15 min para separar a biomassa fúngica do sobrenadante. Com o sobrenadante foi determinada a percentagem de adsorção através de espectrofotometria a 522 nm, que foi o pico de absorbância apresentado pelo corante sem passar por tratamento. A taxa de adsorção foi calculada utilizando a equação 4:

$$\% \text{ de adsorção} = \frac{(\text{absorbância inicial} - \text{absorbância final})}{(\text{absorbância inicial})} * 100$$

Equação 4

Para os fungos que apresentaram maior adsorção no ensaio anterior, o teste foi refeito com três novas concentrações: 200, 300 e 400 mg/L, nas mesmas condições anteriormente citadas. O cálculo da taxa de adsorção foi novamente realizado utilizando a Equação 4.

4.3.5. Determinação da biomassa

Para avaliar o crescimento dos fungos na presença e ausência do corante Vermelho Congo, foi determinada a biomassa de cada um dos ensaios. Primeiramente, tubos de fundo cônico foram secos em estufa a 105 °C por 24 h e então pesados em balança analítica. Cada um dos ensaios do item 4.3 foi centrifugado por 15 min a 4 °C e 10.000 rpm dentro dos tubos previamente secos. O sobrenadante foi reservado e o tubo com o micélio teve a sua massa aferida após um novo período de secagem de 24 h a 105 °C. A

biomassa dos fungos foi então determinada pela diferença entre a massa do tubo seco e a massa do tubo com o micélio.

4.4. Cinética da descoloração

Para verificar a descoloração ao longo do tempo o experimento na concentração de 100 mg/L (descrito no item 4.2.3) foi repetido. Foram feitas triplicatas para cada um dos 7 dias de experimento (repetições destrutivas), as quais foram retiradas a cada 24 h para a análise de descoloração utilizando espectrofotometria conforme 4.3.3. A taxa de descoloração para cada dia foi calculada utilizando a Equação 3.

4.5. Análise de metabólitos por Cromatografia Gasosa associada a Espectrômetro de Massa (GC-MS)

4.5.1. Extração dos metabólitos da degradação do Vermelho Congo

Para a extração dos metabólitos foi utilizado o acetato de etila (Pureza: > 99,5%, Sigma-Aldrich). Uma alíquota de 20 mL do sobrenadante do ensaio de descoloração do corante Vermelho Congo foi adicionado a 10 mL de acetato de etila. Essa mistura foi agitada em vórtex por 5 min para a total obtenção dos metabólitos. Após essa etapa, o conteúdo do tubo foi transferido para um funil de separação, onde permaneceu por 5 min, até a formação completa da interface entre o solvente e o sobrenadante do ensaio. O sobrenadante foi então retirado e passou novamente pelo processo de extração com mais 10 mL de acetato de etila. Essa mistura voltou para o funil de separação, junto com os 10 mL de acetato de etila da primeira extração. Novamente houve o tempo de espera de 5 min para separação das fases e, por fim, os 20 mL totais de acetato de etila foram retirados e armazenados em tubos tipo Falcon.

Ao acetato de etila contendo os metabólitos foi acrescido 1,5 g de sulfato de sódio (Na_2SO_4) para absorver qualquer resquício de solução aquosa. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 3 min a 25 °C e 5000 rpm, o solvente foi filtrado em filtros de seringa de Nylon com diâmetro de 25 mm e poros de 0,20 μm (Analítica) e transferido para tubos de 15 mL. Por fim, as amostras foram concentradas em um concentrador de amostras a 30 °C até a evaporação total do solvente. Os metabólitos

presentes no fundo do tubo foram suspensos em 1 mL de acetato de etila e armazenados a -20 °C em frascos de vidro apropriados para a injeção e posterior análise no GC-MS.

4.5.2. Análise de GC-MS dos metabólitos da degradação do corante Vermelho Congo

Os metabólitos foram avaliados no GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Japão). A separação foi realizada em coluna Rtx-5MS (0.25mm, 30m – Restek, Estados Unidos), sendo 2 µL de amostra injetados a 275 °C, com temperatura na coluna a 100 °C por 3 min aumentando linearmente 9,5 °C por minuto até 280 °C. O gás eluente foi hélio com fluxo de 2 mL por minuto. A análise de massa foi realizada em modo *scan*, com analisador quadrupolo, voltagem de ionização foi de 70 eV, com análise a partir dos 3 min até 18,8 min.

4.6. Análise de crescimento na presença do óleo diesel

Três diferentes meios de cultura foram utilizados para determinar a capacidade dos fungos basidiomicetos de origem antártica na presença de óleo diesel: 1) meio MM; 2) meio MM acrescido de 0,1 g/L de glicose; e 3) meio MM acrescido de 1 g/L de peptona, 5 g/L de malte e 0,1 g/L de glicose. Os três meios foram acrescidos com 2% de diesel estéril. Foram utilizados 3 cilindros de (5 mm de diâmetro) de ágar e micélio para inocular 50 mL de cada um dos meios de cultura em Erlenmeyers de 250 mL que foram incubados a 25 °C e 120 rpm por 14 dias. Os ensaios foram feitos em triplicatas. Como controle foi utilizado o meio PDB. A verificação do crescimento foi feita visualmente nos dias 7 e 14. A avaliação visual seguiu os seguintes parâmetros: alta produção de micélio (+++); produção intermediária de micélio (++); pouca produção de micélio (+) e sem produção de micélio (-).

4.7. Análises Estatísticas

Foi realizado teste de normalidade e o teste de Tukey para comparações múltiplas com o software SigmaPlot 10.0 para as análises de descoloração e adsorção, incluindo a cinética de descoloração. O valor de p considerado foi de $p < 0.05$.

5. Resultados e Discussão

5.1. Caracterização taxonômica dos fungos basidiomicetos de origem Antártica

A caracterização taxonômica com os marcadores moleculares utilizados no presente estudo (escolhidos com base nos trabalhos citados na Tabela 2) permitiu avanços na identificação feita anteriormente (utilizando o marcador ITS) para três dos quatro fungos estudados. Para o isolado 58 que já havia sido identificado como pertencente ao gênero *Schizophyllum*, as novas análises moleculares (Tabela 4 e Anexo A e B) indicaram a similaridade do mesmo com duas possíveis espécies: *S. commune*, utilizando a região ITS e a filogenia gerada por Carreño-Ruiz *et al.* (2019) e *S. radiatum* e *S. commune* com a região LSU e as sequências obtidas no NCBI. Neste caso, análises taxonômicas, com novos marcadores moleculares e estudo da morfologia, seriam necessárias para definir a espécie.

Até aonde vai o nosso conhecimento, os estudos do nosso grupo relatam pela primeira vez o isolamento de fungo do gênero *Schizophyllum* no continente antártico. Como já ocorrido em outros continentes, é provável que o processo de dispersão tenha se dado através da ação humana (FULLER, JOHNSTON & PEARSON, 2013; Santos, 2020). *S. commune* é uma espécie cosmopolita muito comum, comestível e usado medicinalmente, com um importante papel na decomposição de madeira (FULLER, JOHNSTON & PEARSON, 2013). Biotecnologicamente, é um fungo capaz de produzir enzimas degradadoras de lignina e celulose, (TOVAR-HERRERA *et al.*; 2018) com registro de ação na descoloração de corantes sintéticos (CHOI *et al.*, 2020), e biopolímeros que podem ser utilizados em vacinas, terapias anticâncer, preservação de alimentos, espessante de cosméticos e emulsificante (MOHAMMADI *et al.*, 2018). Também é um fungo de interesse médico, já registrado em casos de infecção pulmonar e ocular (CHOWDHARY *et al.*, 2013a; SAHA *et al.*; 2013). *S. radiatum* é menos estudado, mas já foi reportado como produtor de polissacarídeos com atividade antitumoral e, recentemente, como patógeno do trato respiratório humano (SIQUEIRA *et al.*, 2016; LÓPEZ-LEGARDA *et al.*, 2021). Para diferenciar as duas espécies, a principal característica a ser observada morfologicamente é a face superior do píleo: *S. commune* apresenta apenas um tipo de pelugem com grânulos cristalinos e *S. radiatum*, em adição a esse tipo, apresenta também um tipo mais simples, que pode ser ondulado (CARREÑO-RUIZ *et al.*, 2019).

O isolado 177 previamente identificado como pertencente a ordem Russulales, agrupou com o gênero *Gloeocystidiellum* com o marcador ITS (Anexo C), mas com baixa similaridade de sequência (94%) (Tabela 4). Quando foi utilizada a região LSU, houve uma similaridade de sequência de 98% com o gênero *Aleurodiscus* (Tabela 4 e Anexo D). Com a concatenação em *supermatrix* das duas regiões utilizando os dados de Tian *et al.* (2018) (Anexo E), esse isolado foi identificado como pertencendo ao gênero *Aleurodiscus*.

Aleurodiscus também é um gênero de fungos degradadores de madeira. Entretanto, a filogenia do gênero ainda é muito discutida, não havendo concordância entre a caracterização morfológica e molecular (Tian *et al.*, 2018), o que dificulta o posicionamento de novas espécies no grupo. O gênero não possui registro na Antártica, mas já foi relatado em outras áreas geladas como a Patagônia argentina e chilena (GORJÓN, GRESLEBIN & RAJCHENBERG, 2012; TOLEDO *et al.*, 2016; GONZÁLEZ-RAMÍREZ *et al.*, 2018). Representantes desse gênero podem produzir compostos antioxidantes, açúcares, ácidos graxos e compostos fenólicos, com potencial de atividade neuroprotetora (TOLEDO *et al.*, 2016; GONZÁLEZ-RAMÍREZ *et al.*, 2018). Além disso, foi reportada em literatura a capacidade de fungos desse gênero de biotransformação de compostos complexos que fazem parte de rejeitos industriais, incluindo aqueles com corantes (MEI *et al.*, 2020).

Os isolados 320 e 344 previamente identificados como *Pholiota* sp., foram identificados como *Pholiota* cf. *baeosperma* com base nas análises de sequências (Tabela 4) e filogenia utilizando a região ITS, o gene *RPB2* e a *supermatrix* das duas regiões concatenadas (MATHENY *et al.*, 2018) (Anexo F, G e H). A confirmação da espécie necessita de análise por um especialista. Fungos desse gênero são degradadores de madeira e já foram reportados na Ilha Deception na Antártica (HELD & BLANCHETTE, 2016). Em adição, a espécie *P. baeosperma* foi encontrada no lago Central da Ilha Rei George, na Península Fields, Antártica (OGAKI *et al.*, 2020). O gênero é produtor de proteínas antioxidantes com atividade antitumoral (GAN *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2013) e é referência como produtor de enzimas ligninolíticas, incluindo a lacase e a manganês peroxidase (KIISKINEN, RÄTTÖ & KRUUS, 2004; SINGH & SINGH, 2015; KOBAYASHI, 2020).

Tabela 4 – Relação de similaridade e números de acesso no GenBank das sequências recuperadas no NCBI para construção das árvores filogenéticas.

Espécie	Similaridade (%)	Linhagem	Query cover (%)	GenBank N° de acesso
58 ITS				
<i>Schizophyllum commune</i>	98,23	FMR 14713	94	LT217532.1
<i>Schizophyllum commune</i>	98,56	CBS 476.64	92	LT217531.1
<i>Schizophyllum radiatum</i>	98,04	CBS 301.32	93	LT217537.1
<i>Schizophyllum radiatum</i>	98	CBS 301.32	100	AY571060.1
58 LSU				
<i>Schizophyllum radiatum</i>	100	CBS 199.27	100	LT217570.1
<i>Schizophyllum radiatum</i>	99,66	CBS 301.32	99	AF261588.1
<i>Schizophyllum commune</i>	99,83	CBS 124811	100	MH874930.1
<i>Schizophyllum commune</i>	99,83	CBS 579.83	100	MH873368.1
<i>Schizophyllum amplum</i>	97,34	CBS 228.97	100	AY570992.1
<i>Schizophyllum umbrinum</i>	97,34	FL02.1	100	AF261590.1
<i>Schizophyllum umbrinum</i>	97,13	MUCL43017	98	LT217594.1
177 ITS				
<i>Gloeocystidiellum friesii</i>	94,08	CBS 323.66	81	MH858806.1
<i>Conferticium ravum</i>	90,98	CBS 125849	85	MH863805.1
<i>Acanthophysium thoenii</i>	90,81	CBS 236.86	85	MH861950.1
<i>Xylobolus frustulatus</i>	90,53	CBS 271.28	85	MH855009.1
<i>Aleurodiscus dextrinoideocerussatus</i>	90,38	CBS 126041	85	MH864056.1
<i>Xylobolus illudens</i>	90,28	CBS 360.36	85	MH855822.1
<i>Conferticium ravum</i>	90,98	CBS 125849	85	MH863805.1
<i>Aleurodiscus thailandicus</i>	89,98	BJFC He4099	86	NR_153577.1
<i>Acanthophysium thoenii</i>	90,81	CBS 236.86	85	MH861950.1
<i>Xylobolus frustulatus</i>	90,53	CBS 271.28	85	MH855009.1
<i>Aleurodiscus dextrinoideocerussatus</i>	90,38	CBS 126041	85	MH864056.1
<i>Xylobolus illudens</i>	90,28	CBS 360.36	85	MH855822.1
177 LSU				
<i>Aleurodiscus tropicus</i>	97,85	BJFC 022332	100	NG_068534.1
<i>Aleurodiscus dextrinoideophyses</i>	97,77	BJFC He4078	100	NG_068542.1
<i>Aleurodiscus tenuissimus</i>	97,61	BJFC 022075	100	NG_068536.1
<i>Aleurodiscus thailandicus</i>	97,61	BJFC He4099	100	NG_068541.1
<i>Aleurodiscus verrucosporus</i>	97,45	BJFC He4491	100	NG_068543.1
<i>Aleurodiscus effusus</i>	95,62	BJFC He2261	100	NG_068769.1
<i>Fomitopsis eucalypticola</i>	94,90	BJFC 029897	100	NG_068654.1
<i>Aleurodiscus dextrinoideocerussatus</i>	98	He2820	100	MH109044.1
<i>Aleurodiscus isabellinus</i>	97,77	He5294	100	MH109047.1
<i>Aleurodiscus sichuanensis</i>	96,74	He4935	100	LC430907.1
<i>Aleurodiscus subroseus</i>	96,02	He4895	100	LC430910.1
320 e 344 ITS				
<i>Pholiota baeosperma</i>	100	TFB8315	100	KY559332.1
<i>Pholiota baeosperma</i>	99,86	TFB7383	100	MG735312.1
<i>Pholiota multicingulata</i>	95,53	ET23	100	MN209761.1
<i>Pholiota lubrica</i>	94,12	ET41	100	MN209752.1
<i>Pholiota stratosa</i>	94,09	AHS64684	100	MN209779.1
<i>Pholiota occidentalis</i>	93,83	AHS58470	100	MN209765.1

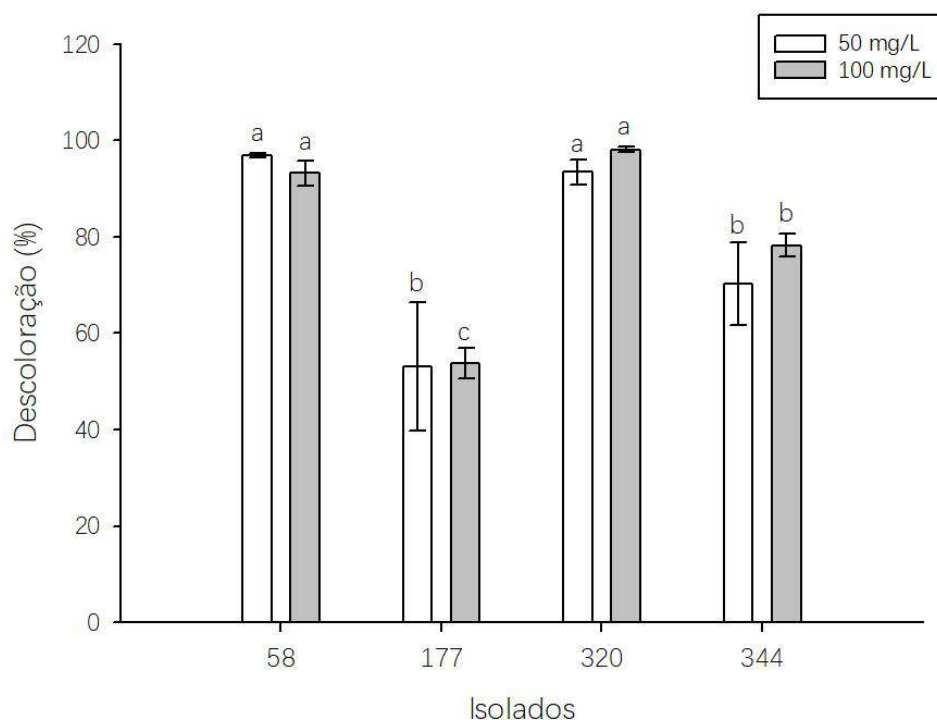
<i>Pholiota decorata</i>	93,68	AHS54770	100	MN209734.1
<i>Pholiota virgata</i>	93,38	B763	100	MN209782.1
<i>Pholiota lenta</i>	93,24	PBM4233	100	MN209743.1
<i>Pholiota spumosa</i>	93,12	ET12	100	MN209776.1
<i>Pholiota lúrida</i>	93	AHS66386	100	MN209757.1
<i>Pholiota flavopallida</i>	92,86	ET38	100	MN209737.1
<i>Pholiota fulvozonata</i>	92,52	AHS73887	100	MG735290.1
<i>Pholiota virescentifolia</i>	92,96	TENN 020591	87	NR_119911.1
<i>Hebeloma sinapizans</i>	88,84	BR5020184118648	100	NR_152910.1
320 e 344 RPB2				
<i>Pholiota baeosperma</i>	100	TFB8315	100	MF978336.1
<i>Pholiota baeosperma</i>	98,77	TFB7383	100	MF978357.1
<i>Pholiota molesta</i>	94,92	AHS65008	100	MG923694.1
<i>Pholiota multicingulata</i>	94,61	-	100	HQ832440.1
<i>Pholiota molesta</i>	94,88	MTS4953a	99	MG923696.1
<i>Pholiota highlandensis</i>	94,29	PBM4085	99	MH360729.1
<i>Pholiota highlandensis</i>	94,29	FIRE387	99	MH360727.1
<i>Pholiota occidentalis</i>	94,14	AHS58470	100	MN329724.1
<i>Pholiota brunnescens</i>	93,22	ET22	100	MN329702.1
<i>Pholiota brunnescens</i>	93,22	ET32	100	MN329701.1
<i>Pholiota mixta</i>	92,76	PBM2409	100	MG923703.1
<i>Pholiota multicingulata</i>	92,76	ET23	100	MN329722.1
<i>Pholiota lubrica</i>	92,75	ET4	99	MN329717.1
<i>Pholiota lubrica</i>	92,75	ET36	99	MN329720.1
<i>Pholiota flavopallida</i>	92,60	ET38	100	MN329704.1
<i>Pholiota spumosa</i>	92,44	PBM2849	99	MG923698.1
<i>Pholiota castânea</i>	92,30	DPL7769	100	MG923702.1
<i>Pholiota squarrosa</i>	89,51	ET26	99	MN329733.1
<i>Pholiota flammans</i>	88,43	ET30	99	MN329703.1
<i>Pholiota limonella</i>	87,56	ET17	99	MN329709.1
<i>Pholiota abietis</i>	87,12	ET14	99	MN329696.1
<i>Pholiota adiposa</i>	87,40	ET37	99	MN329697.1
<i>Pholiota jahnii</i>	86,81	ET11	99	MN329705.1
<i>Pholiota aurivella</i>	86,35	ET42	99	MN329699.1
<i>Pholiota nameko</i>	85,58	ET7	96	MN329723.1

5.2. Biodegradação do corante Vermelho Congo

5.2.1. Descoloração e toxicidade

Os resultados de descoloração do corante têxtil Vermelho Congo estão apresentados na Figura 5. Os fungos *Schizophyllum* sp. 58 e *Pholiota* cf. *baeosperma* 320 foram os que apresentaram os melhores resultados, sendo 96,9% e 93,4% de descoloração para a concentração 50 mg/L e 93,2% e 97,9%, para a concentração 100 mg/L, respectivamente.

Figura 5 - Descoloração do corante Vermelho Congo (%) nas concentrações 50 mg/L e 100 mg/L pelos isolados 58, 177, 320 e 344, após incubação de 7 dias a 25 °C e 120 rpm. Médias seguidas por diferentes letras indicam diferença significativa entre os isolados de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).



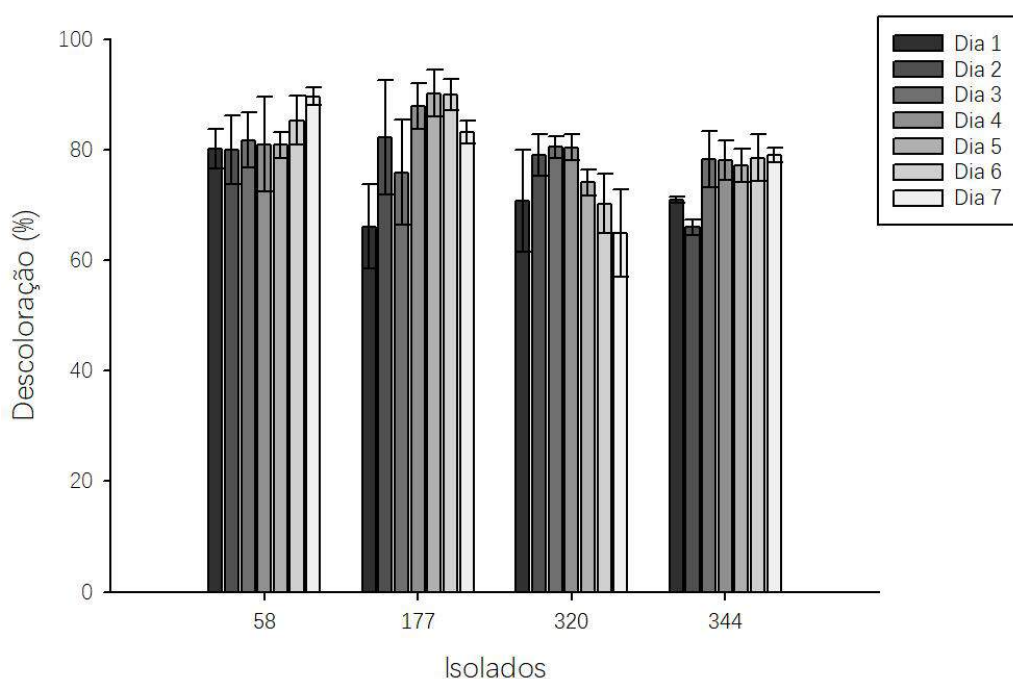
Após as análises estatísticas, pode-se afirmar que em ambos os casos não houve diferença significativa entre os dois ensaios com as diferentes concentrações, os fungos com os melhores desempenhos mantiveram a eficiência mesmo com o dobro de corante no meio de cultivo. Nos estudos realizados por Tang, Jia & Zhang (2011) e Li & Jia (2008), fungos do gênero *Schizophyllum* foram utilizados para descoloração de Vermelho Congo em meio de cultura líquido e em sistema de fermentação em estado sólido, sendo o primeiro o que apresentou melhores resultados, acima de 90% de descoloração, o que corrobora os resultados obtidos no presente trabalho. Entretanto, o produto da degradação do corante foi benzidina, uma amina carcinogênica, o que ressalta a necessidade de verificação da toxicidade final do bioensaio, assim como os possíveis metabólitos resultantes da degradação.

A descoloração de corantes azo, como o Vermelho Congo, por fungos basidiomicetos é bem documentada; essa preferência é baseada no arsenal enzimático proveniente desses fungos de podridão branca. Nozaki *et al.* (2008) estudaram 21 fungos basidiomicetos, dentre eles espécies do gênero *Pholiota*, contra corantes têxteis, incluindo

mono e diazo, de difícil degradação. Os fungos do gênero *Pholiota* testados obtiveram bons resultados, descolorindo mais de 70 % de alguns dos corantes azo. Já no *screening* de Lucas *et al.* (2008) feito com mais de 300 linhagens de 76 gêneros diferentes de fungos de podridão branca frente à degradação de corantes têxteis, incluindo cinco azos, o gênero *Pholiota* não ultrapassou o patamar de 30 % de descoloração.

Nos estudos realizados por Tang, Jia & Zhang (2011) com o fungo do gênero *Schizophyllum*, a obtenção de mais de 90 % de descoloração do corante Vermelho Congo na concentração de 100 mg/L aconteceu após cinco dias de ensaio. Os resultados da análise da cinética de descoloração (Figura 6), com acompanhamento diário, revelaram que o fungo *Schizophyllum* sp. 58 atingiu o máximo de descoloração de 89 % no sétimo dia. O fungo *Aleurodiscus* sp. 177 chegou nesse patamar de descoloração no dia cinco, com uma diminuição de 10 % até o último dia de ensaio, o que poderia indicar que uma parte do corante que havia sido adsorvida começou a ser liberada do micélio de volta ao meio de cultivo. Para os dois isolados *Pholiota* cf. *baeosperma*, houve uma média de 70 % de descoloração em todos os dias do experimento.

Figura 6 – Cinética de descoloração do corante Vermelho Congo na concentração de 100 mg/L, após incubação de 7 dias a 25 °C e 120 rpm.



Em outros estudos com fungos basidiomicetos no processo de descoloração de corantes azo já foi registrado um percentual de 80% de descoloração após um período de incubação de apenas 48 h (WANG *et al.*, 2017). Entretanto, os fungos utilizados nesses estudos apresentavam temperaturas de crescimento acima de 25 °C, o que pode levar a um metabolismo e síntese de enzimas mais rápido do que os psicrófilos e psicrotolerantes provenientes de áreas geladas, como os utilizados no presente estudo. Apesar do metabolismo mais lento, fungos com adaptações a condições frias podem ser uma alternativa de biorremediação para áreas que as temperaturas naturais são baixas, não necessitando de gastos adicionais com aumento de temperatura para o crescimento de micélio.

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados de fitotoxicidade após os experimentos de descoloração do Vermelho Congo pelos basidiomicetos de origem Antártica. Para a menor concentração de corante (50 mg/L), a toxicidade observada foi inferior àquela obtida no experimento controle, o qual apresentava apenas o corante com o meio de cultivo MM. Os fungos *Aleurodiscus* sp. 177 e *Pholiota* cf. *baeosperma* 320 e 344 conseguiram diminuir a toxicidade do controle em 100%, o que pode indicar a eficiência em degradar o corante até compostos menos tóxicos. Entretanto, para a concentração de 100 mg/L, apenas o fungo *Schizophyllum* sp. 58 apresentou uma toxicidade menor após o tratamento, conseguindo diminuir em 92% a toxicidade do controle. Os outros três fungos apresentaram um aumento na toxicidade após o tratamento: para *Aleurodiscus* sp. *Pholiota* cf. *baeosperma* 344, esse aumento foi bem baixo, menos de 2% de acréscimo. Por outro lado, *Pholiota* cf. *baeosperma* 320 apresentou quase o dobro da toxicidade do controle de 100 mg/L de corante Vermelho Congo. Esse aumento na toxicidade do corante após o tratamento pode ser um indicativo de que os subprodutos provenientes da biodegradação são mais tóxicos que o produto inicial (ASSES *et al.*, 2018). Um tempo de tratamento mais prolongado, ou a presença de outros micro-organismos degradadores, poderia resultar na transformação/metabolização do composto tóxico. Resultado similar foi observado em um outro estudo do grupo de pesquisa, onde foi verificado o aumento da toxicidade após tratamento enzimático do corante têxtil azul reativo com lacases do fungo basidiomiceto de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (FONTES *et al.*, 2021).

O aumento da toxicidade concomitantemente com o aumento da concentração do corante já foi registrado em tratamentos de corantes azo por basidiomicetos por Almeida

et al. (2021), onde as concentrações de corante foram as mesmas utilizadas no presente trabalho (50 e 100 mg/L). No trabalho de Almeida *et al.* (2021) foi observado dois tipos de comportamento pós tratamento: diminuição e aumento da toxicidade, demonstrando que a remoção de cor não pode ser o único parâmetro a ser acompanhado em processos de biodegradação de corantes, já que os metabólitos finais podem ser mais tóxicos do que a molécula original.

Tabela 5 - Ensaio de toxicidade dos tratamentos após período de incubação dos basidiomicetos da Antártica na presença do corante Vermelho Congo por 7 dias a 25 °C e 120 rpm. * Toxicidade após o tratamento foi maior do que a registrada no controle. Médias seguidas por diferentes letras indicam diferença significativa entre os isolados de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Ensaio	Código isolado	Concentração (mg/L)	Toxicidade (%)	Destoxificação (%)
Controle	-----	50	21,69 ± 6,6 a	-----
		100	15,79 ± 3,4 b	
<i>Schizophyllum</i> sp.	58	50	2,89 ± 2,3 b	86,7
		100	0,37 ± 3,0 c	92,1
<i>Aleurodiscus</i> sp.	177	50	0,00 b	100
		100	45,58 ± 3,6 a	0*
<i>Pholiota</i> cf. <i>baeosperma</i>	320	50	0,00 b	100
		100	16,12 ± 10,5 b	0*
<i>Pholiota</i> cf. <i>baeosperma</i>	344	50	0,00 b	100
		100	17,54 ± 0,47 b	0*

5.2.2. Atividade enzimática

Apenas uma das três principais enzimas ligninolíticas estudadas, a lacase, foi detectada nos ensaios com o corante Vermelho Congo (Tabela 6). Para manganês peroxidase e lignina peroxidase não foi possível, nas condições testadas, detectar atividade enzimática em nenhuma das duas concentrações do corante. Para lacase, o isolado *Pholiota* cf. *baeosperma* 320 foi o que apresentou a maior atividade enzimática, sendo a maior atividade registrada na concentração de 100 mg/L do corante têxtil Vermelho Congo.

Resultado semelhante foi observado por Nozaki *et al.* (2008), onde os 21 fungos basidiomicetos utilizados para a descoloração de diversos tipos de corantes, incluindo azos, apresentaram atividade de lacase e apenas um apresentou pouca atividade para manganês peroxidase, o que leva à hipótese de que a enzima principal atuante na

descoloração seria a lacase ou outras oxiredutases que não foram o alvo do trabalho. Tavares *et al.* (2019) utilizaram extratos enzimáticos do fungo basidiomiceto *Lentinus crinitus* para a degradação de dois corantes azo e observaram que o pico de produção de lacase foi apenas no décimo dia de ensaio e que as outras duas enzimas ligninolíticas (lignina peroxidase e manganês peroxidase) não foram produzidas no meio de cultivo com adição de nitrogênio. O meio mínimo mineral utilizado no presente trabalho conta com nitrogênio na sua formulação, o que pode ter sido um fator chave na ausência de atividade dessas enzimas. Em contrapartida, nos estudos de Asses *et al.* (2018) com fungos ascomicetos aplicados a biorremediação do Vermelho Congo, a lacase foi a única enzima não detectada, com a maior atividade sendo a de manganês peroxidase.

Em alguns trabalhos da literatura, a manganês peroxidase é reportada como a principal enzima associada a degradação de corantes azo, tanto por basidiomicetos quanto por ascomicetos. Para basidiomicetos, Rao *et al.* (2019) registraram 72% de produtores dessa enzima dentre os 30 fungos estudados. Além disso, foi registrada uma queda na produção de lacase assim que a síntese de manganês peroxidase entrou em fase exponencial. Nos estudos de Tang, Jia & Zhang (2010) não foi possível definir qual enzima era a principal responsável pelo processo de degradação dos corantes sintéticos, já que os valores de lacase e manganês peroxidase variaram ao longo do tratamento, enquanto o processo de descoloração manteve-se estável. Bonugli-Santos *et al.* (2016) reportaram a produção e detecção de genes de lacase e manganês peroxidase durante o processo de descoloração/degradação do azocorante Preto reativo 5 pelo fungo basidiomiceto de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063.

O gênero *Schizophyllum* já foi reportado como produtor de manganês peroxidase, que, ao ser purificada, conseguiu degradar corantes azo, incluindo o Vermelho Congo (XIAOBIN *et al.*, 2007) em até 30% após 60 min de incubação. Li *et al.* (2009) também utilizaram a manganês peroxidase produzida pelo fungo *Schizophyllum* para degradação do Vermelho Congo, entretanto, a concentração do corante era muito baixa (25 e 50 mg/L) e, ainda assim, a porcentagem de descoloração foi de apenas 20%. Esses resultados indicam a importância da combinação da ação enzimática com o poder de adsorção do micélio para a descoloração de corantes azo.

Além das enzimas ligninolíticas, Li *et al.* (2013) revelaram a eficácia de cloroperoxidasas na degradação e descoloração do corante Vermelho Congo, conseguindo uma descoloração de mais de 80% em 3 min de incubação. As

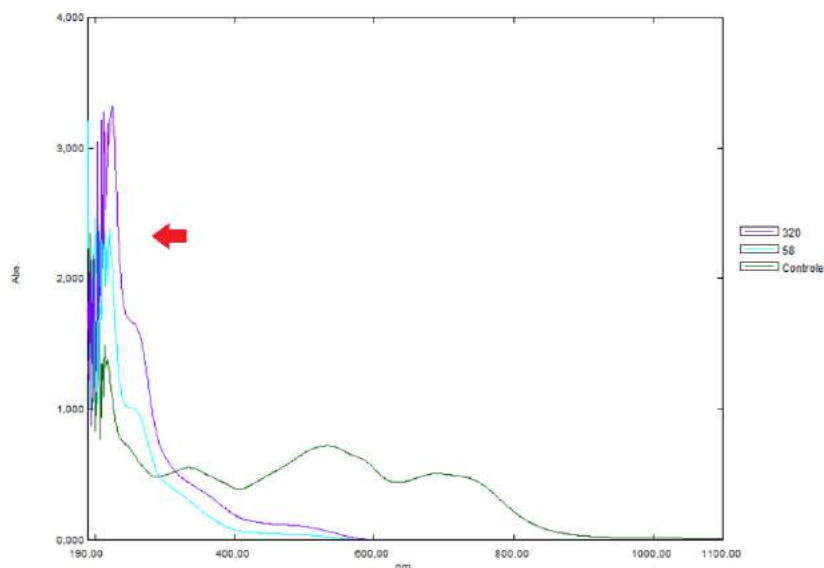
cloroperoxidasas são enzimas que contêm uma porção heme e são extremamente versáteis, podendo apresentar atividade semelhante a peroxidases, catalases e enzimas do complexo citocromo P450, além de catalisarem a cloração de ligações C-H. Em pesquisas genômicas de basidiomicetos, já foram encontradas muitas sequências putativas para essa enzima (ENSHASY *et al.*, 2019). A existência dessas rotas alternativas de degradação abre uma gama de novas possibilidades de pesquisa com os basidiomicetos antárticos, levando em consideração que a atividade da enzima ligninolítica lacase foi baixa (menor do que 5 U/L).

Tabela 6 - Atividade enzimática após o período de incubação dos basidiomicetos da Antártica na presença do corante Vermelho Congo por 7 dias a 25°C e 120 rpm. Lac: lacase, LiP: lignina peroxidase e MnP: manganês peroxidase. Médias seguidas por diferentes letras indicam diferença significativa entre os isolados, em cada concentração, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fungo	Código isolado	Concentração (mg/L)	Atividade enzimática (U/L)		
			Lac	LiP	MnP
<i>Schizophyllum</i> sp.	58	50	0,56 ± 0,5 b	0	0
		100	0,25 ± 0,1 b	0	0
<i>Aleurodiscus</i> sp.	177	50	0,81 ± 0,5 b	0	0
		100	2,64 ± 1,9 b	0	0
<i>Pholiota</i> cf. <i>baeosperma</i>	320	50	5,16 ± 0,3 a	0	0
		100	8,89 ± 0,3 a	0	0
<i>Pholiota</i> cf. <i>baeosperma</i>	344	50	2,89 ± 1,6 ab	0	0
		100	1,9 ± 0,1 b	0	0

Mesmo com a baixa atividade enzimática observada, as curvas obtidas no espectrofotômetro (Figura 7) indicam que há um processo de degradação acontecendo, pois além da mudança de coloração do meio de cultura, há a formação de novos picos, que não existiam na curva padrão do controle, o que pode significar que houve uma mudança na estrutura química do composto inicial. Curvas semelhantes foram encontradas por Asses *et. al* (2018) e Tang, Jia & Zhang (2011) que comprovaram o aparecimento de novos compostos aromáticos no processo de descoloração de corantes sintéticos, como o Vermelho Congo.

Figura 7 - Espectrofotometria indicando (seta vermelha) o surgimento de novos picos nos bioensaios com os fungos *Schizophyllum* sp. 58 e *Pholiota* cf. *baeosperma* 320.



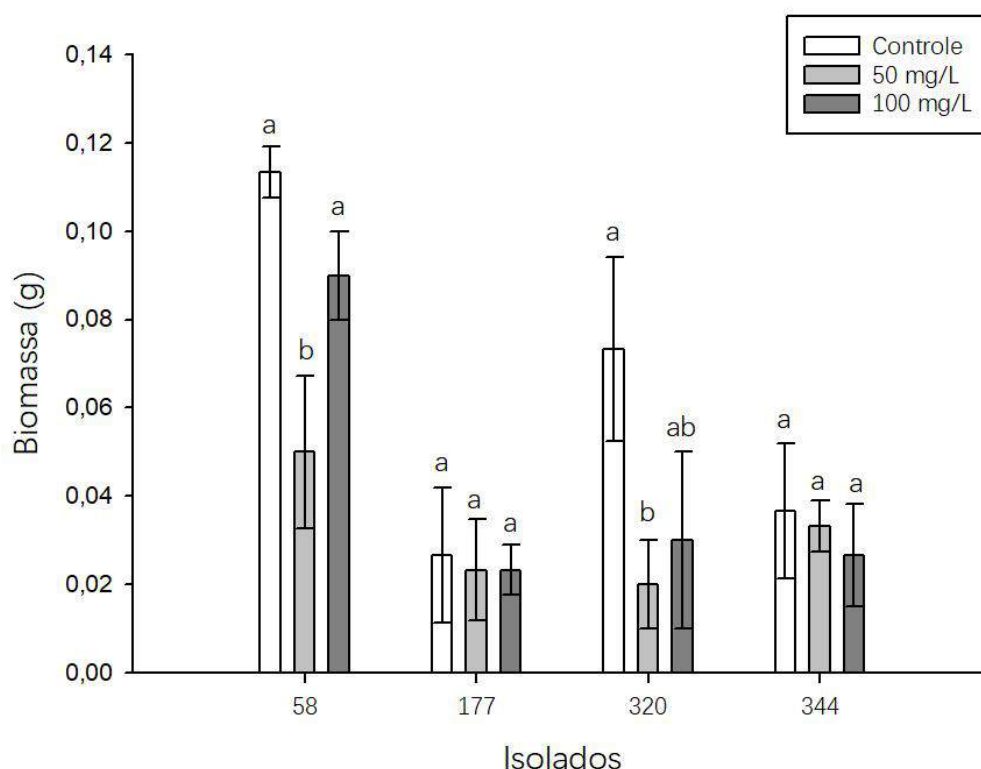
5.2.3. Biomassa

A produção de biomassa fúngica foi avaliada na presença e na ausência do corante têxtil Vermelho Congo (Figura 8). Para os fungos *Schizophyllum* sp. 58 e *Pholiota* cf. *baeosperma* 320 houve diferença significativa entre a biomassa produzida no controle (sem adição de corante) e na concentração de 50 mg/L, sendo que na presença do corante a produção de biomassa foi menor. Na concentração de 100 mg/L, *Schizophyllum* sp. 58 não apresentou diferença significativa entre a biomassa do controle e do tratamento, enquanto para *Pholiota* cf. *baeosperma* 320 não houve diferença significativa, tanto quando comparado ao controle como quando comparado à menor concentração de corante. Para os outros dois isolados (*Aleurodiscus* sp. 177 e *Pholiota* cf. *baeosperma* 344) não houve diferença significativa entre a quantidade de biomassa produzida nos bioensaios e no controle.

Nos estudos de Asses *et al.* (2018) a biomassa do fungo ascomiceto *Aspergillus niger* aumentou na presença do corante Vermelho Congo. Por outro lado, Wang *et al.* (2017) reportaram que a biomassa dos fungos basidiomicetos no controle (sem o corante) foi maior do que aquela registrada nos bioensaios com a adição do Vermelho Congo.

Os resultados obtidos no presente estudo e em estudos realizados por outros grupos de pesquisa revelam que a capacidade de produção de biomassa (crescimento) na presença do corante Vermelho Congo é dependente do micro-organismo e das condições utilizadas nos experimentos.

Figura 8 - Produção de biomassa após incubação por 7 dias a 25 °C e 120 rpm. Médias seguidas por diferentes letras indicam diferença significativa entre as concentrações e o controle (sem fungo) de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).



5.3. Adsorção

A adsorção é um importante mecanismo de biorremediação, podendo agir em conjunto com a degradação enzimática, elevando o potencial de descoloração de corantes no meio de cultura. O ensaio de adsorção foi realizado para verificar a porcentagem da descoloração pelo mecanismo de adsorção do corante junto ao micélio fúngico. Durante a condução dos bioensaios ficou evidente que o micélio estava adsorvendo uma porção do corante (Figura 9), tendo em vista o tom avermelhado dos micélios fúngicos. Como pode ser observado na Figura 10, os isolados apresentaram adsorção entre 48 e 92% do corante no micélio inativado.

Figura 9 – Micélio do fungo *Schizophyllum* sp. 58 após sete dias em ensaio com o corante Vermelho Congo, com incubação a 25 °C e 120 rpm. A da esquerda para a direita: controle e duplicata do fungo *Schizophyllum* sp. 58; B da esquerda para a direita: controle e duplicata do fungo *Schizophyllum* sp. 58 após sete dias. Fonte: a autora.

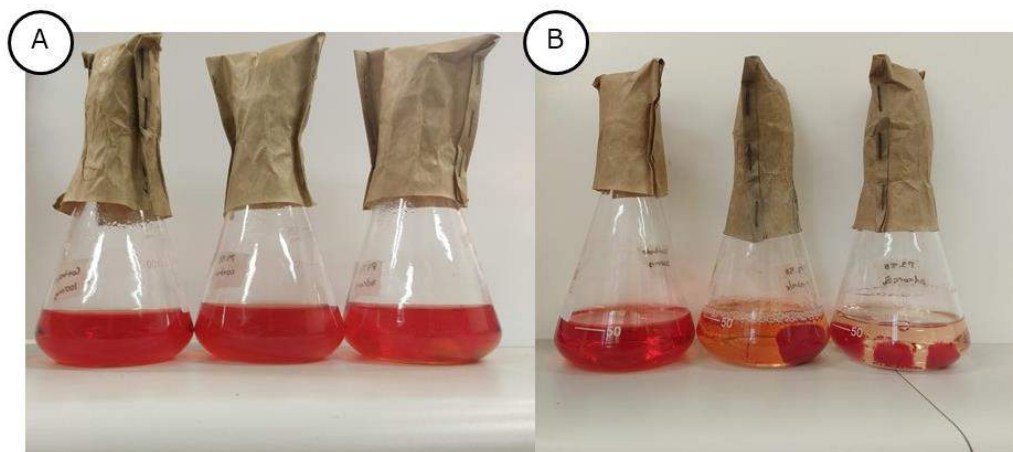
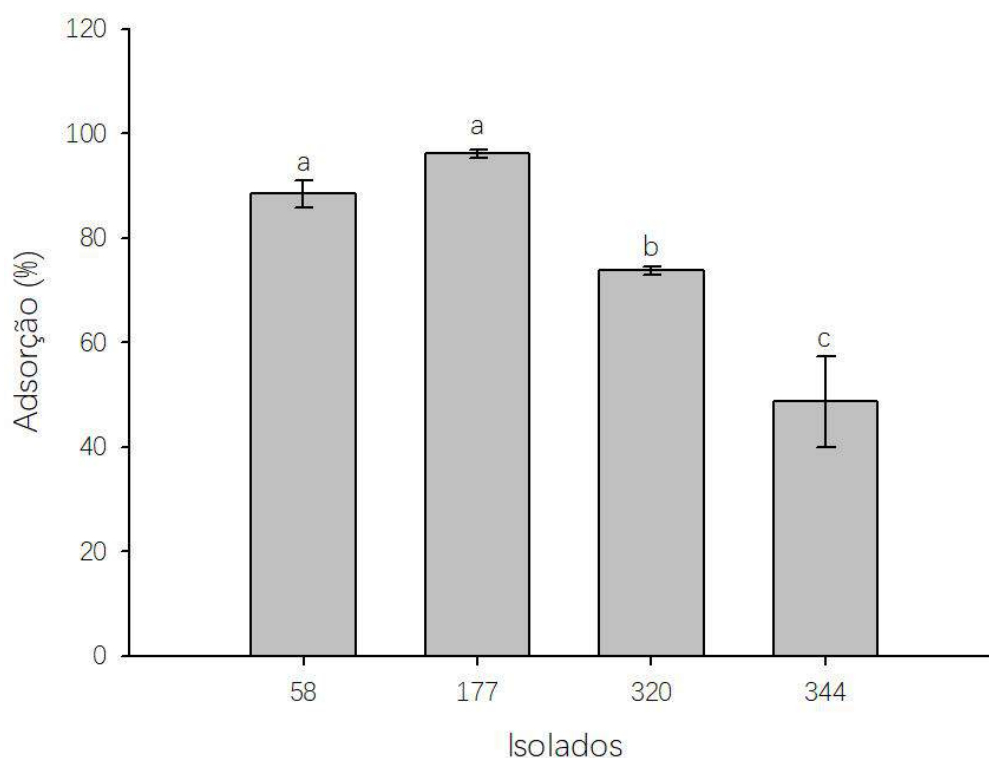


Figura 10 - Adsorção de corante Vermelho Congo na concentração de 100 mg/L após período de incubação de 7 dias a 25 °C e 120 rpm. Médias seguidas por diferentes letras indicam diferença significativa entre os isolados de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

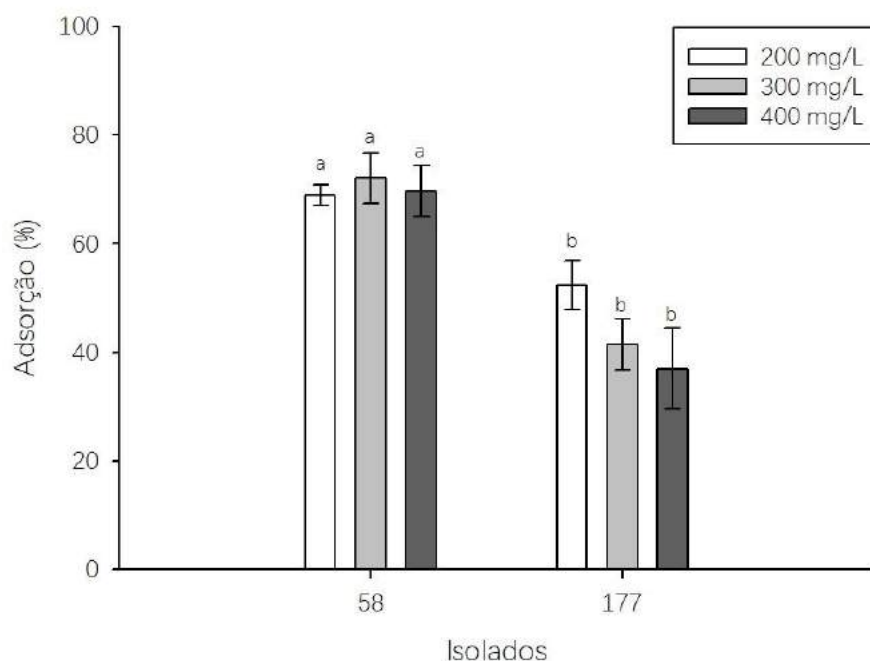


O fungo *Pholiota* cf. *baeosperma* 320 que apresentou os resultados de descoloração mais expressivos (97,87%) na concentração mais alta do corante, adsorveu 73% do Vermelho Congo nos experimentos com o micélio inativado. Esse fungo apresentou a maior produção de lacase, na concentração de 100 mg/L, em comparação com os outros isolados (Tabela 6). Esses resultados indicam que parte da descoloração foi alcançada devido ao metabolismo do fungo, o que foi também demonstrado por Asses *et al.* (2018) em experimentos utilizando *Aspergillus niger*. Os autores verificaram descoloração de 97% do corante, resultante da combinação da biodegradação (70%) e adsorção (27%). O mesmo comportamento foi observado para o fungo *Pholiota* cf. *baeosperma* 344 que apresentou 77% de descoloração no bioensaio e cerca de 50% de adsorção com o micélio inativo.

Por outro lado, a descoloração do corante promovida pelo fungo *Aleurodiscus* sp. 177 pode ter ocorrido apenas pelo mecanismo de adsorção, visto que seu desempenho foi de 55% no bioensaio de descoloração e de 96% no experimento com o micélio inativo. No caso do fungo *Schizophyllum* sp. 58, a descoloração foi de 93% e a adsorção pelo micélio inativo foi de cerca de 90%. No estudo utilizando um representante do mesmo gênero (*Schizophyllum*) reportado por Tang, Jia & Zhang (2011) também não houve diferença significativa entre as condições com o micélio vivo e inativado nos experimentos de degradação do corante Vermelho Congo.

Para verificar a capacidade de adsorção dos fungos que apresentaram as maiores taxas na concentração de 100 mg/L (*Aleurodiscus* sp. 177 e *Schizophyllum* sp. 58), outras três concentrações do corante Vermelho Congo foram testadas (Figura 11). O fungo *Schizophyllum* sp. 58 manteve uma média de 70 % de adsorção nas três novas concentrações, enquanto o fungo *Aleurodiscus* sp. 177 adsorveu 57 % na concentração de 200 mg/L, diminuindo esse valor para 41 e 36 %, nas concentrações de 300 e 400 mg/L, respectivamente. Segundo Wang *et al.* (2017), o aspecto chave na eficiência da adsorção por um inóculo inativo é a área de superfície do *pellet*. A diferença de adsorção entre os dois fungos é provavelmente causada por essa variável, uma vez que, mesmo utilizando a mesma quantidade de inóculo inicial (3 plugs), ao final dos sete dias de incubação os plugs de *Schizophyllum* sp. 58 aderiram um ao outro, gerando uma área de superfície maior, o que, conseqüentemente, pode ter levado a um melhor desempenho.

Figura 11 - Adsorção de corante Vermelho Congo com concentração de 100 mg/L após período de incubação de 7 dias a 25 °C e 120 rpm. Médias seguidas por diferentes letras indicam diferença significativa entre os isolados de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).



5.4. Metabólitos de degradação GC-MS

A partir dos resultados de descoloração e adsorção do corante Vermelho Congo, os isolados 58 (*Schizophyllum* sp.) e 344 (*Pholiota* cf. *baeosperma*) foram selecionados para terem os seus metabólitos analisados em GC-MS, o primeiro por apresentar adsorção e descoloração superiores a 80% e o segundo, por ser o que apresentou a menor taxa de adsorção (48%), o que poderia ser um indicativo de que a descoloração foi resultado da quebra enzimática da molécula do corante.

Os espectros obtidos após análises de GC-MS dos bioensaios com o fungo *Pholiota* cf. *baeosperma* 344 utilizando 50 mg/L e 100 mg/L do corante Vermelho Congo estão apresentados nas Figuras 12 e 13, respectivamente.

Figura 12 – Compostos identificados por GC-MS do isolado *Pholiota* cf. *baeosperma* 344 após incubação por 7 dias a 25 °C e 120 rpm na presença do corante Vermelho Congo (concentração de 50 mg/L). A: benzeno 1,3-bis(1,1 dimetiletil); B: ácido benzóico 4-metil; C: di-O-4-toluoyl-d-ácido tartárico; D: 1-heptanol, 2,4-dietil; E: ácido sulfúrico- pentil undecil ester; F: fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil); G: 9,9-Dimethoxybicyclo[3.3.1]nona-2,4-dione; H: ácido oxálico; I: ácido

tetradecanóico; J: bis(tridecil) ftalato; K: ácido hexadecanóico; L: ácido octadecanóico. Em azul os compostos de degradação e em verde os compostos naturais de basidiomicetos. As setas vermelhas indicam os picos que foram detectados apenas no controle. Linha azul representa o controle, linha preta o bioensaio.

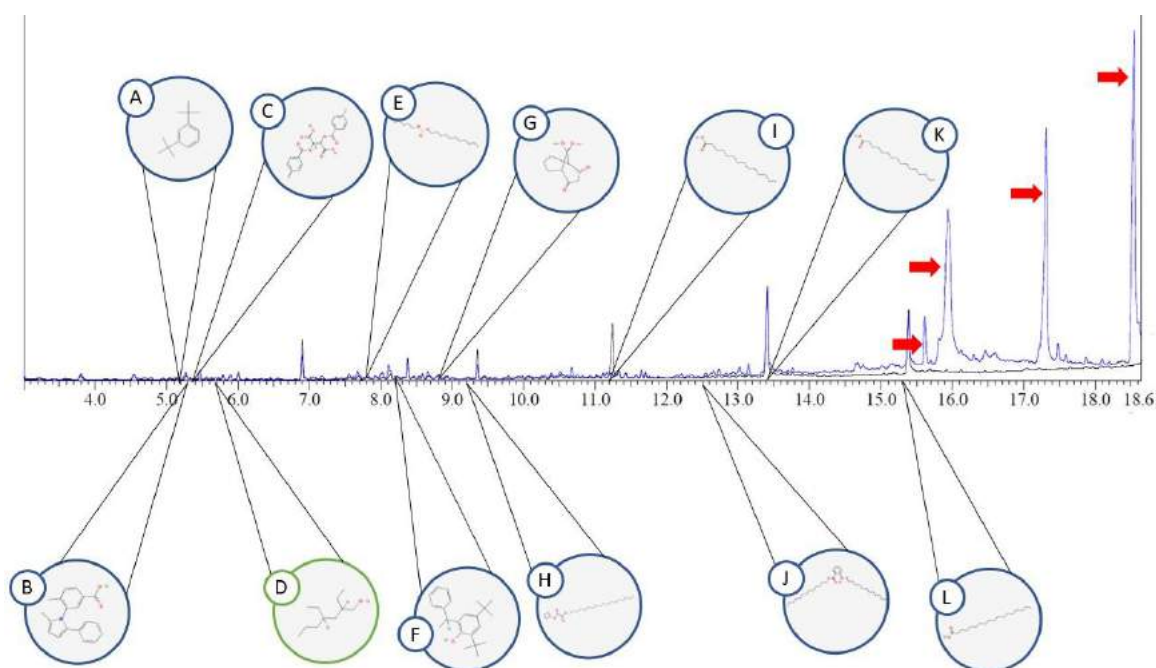
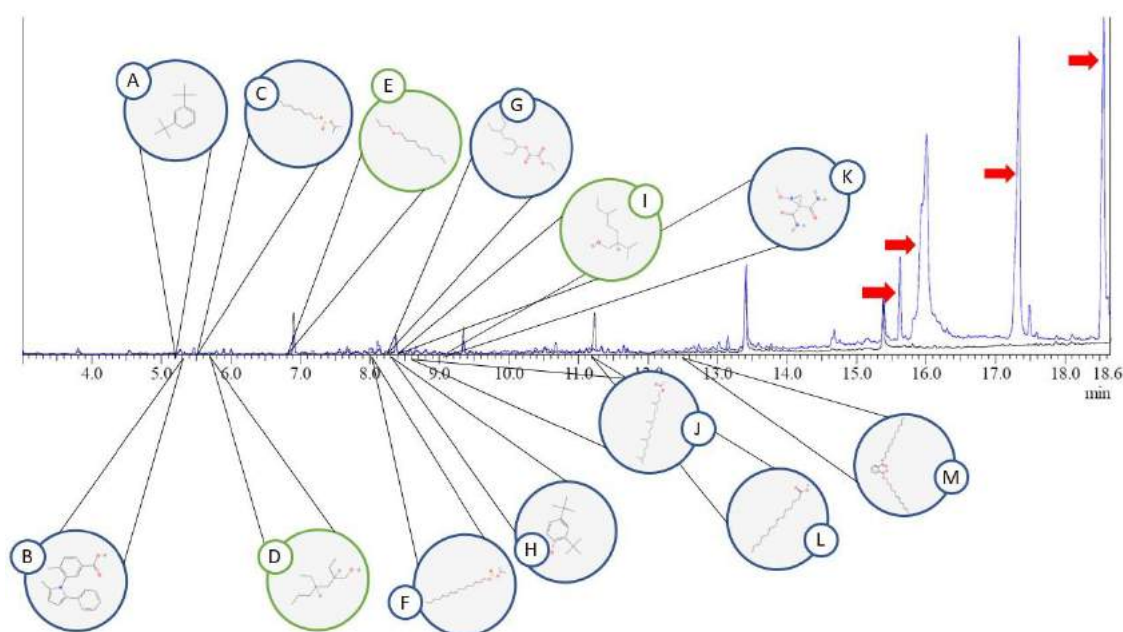


Figura 13 – Compostos identificados por GC-MS do isolado *Pholiota cf. baeosperma* 344 após incubação por 7 dias a 25 °C e 120 rpm na presença do corante Vermelho Congo (concentração de 100 mg/L). A: benzeno 1,3-bis(1,1 dimetiletil); B: ácido benzóico 4-metil; C: ácido sulfúrico, dodecil 2-propil ester; D: 1-heptanol, 2,4-dietil; E: octano; F: ácido sulfúrico, pentadecil 2-propil ester; G: ácido oxálico; H: fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil); I: 2-isopropil, 5-metil, 1-heptanol); J: ácido acético, 3,7,11,15-tetrametil-hexadecil ester; K: N-Methoxy-2,2-dicarbamoylaziridine; L: ácido tetradecanóico; M: bis(tridecil) ftalato. Em azul os compostos de degradação e em verde os compostos naturais de basidiomicetos. As setas vermelhas indicam os picos que foram detectados apenas no controle. A linha azul indica o controle, e a preta o bioensaio.



O primeiro composto alvo encontrado nas análises a partir do ensaio com o fungo *Pholiota cf. baeosperma* 344 foi uma variação da molécula de benzeno (Benzene, 1,3-bis(1,1-dimetilet)), um hidrocarboneto aromático, que foi detectado no tempo de retenção (TR) 5,2 min, tanto para o ensaio com 50 mg/L quanto com 100 mg/L (Figuras 12A e 13A). A mesma molécula já foi apontada como sendo um dos principais produtos da degradação do Vermelho Metil, outro corante azo, com conformação semelhante à da molécula de Vermelho Congo (EL-RAHIM *et al.*, 2021). Essa molécula de benzeno é classificada como um terpenóide e pode ter ação alelopática, interferindo na síntese de proteínas, lipídios e amino ácidos, respiração e fotossíntese em plantas, levando a um menor desenvolvimento (KAIIRA *et al.*, 2021). A presença mais de uma vez no ensaio na concentração de 100 mg/L do corante Vermelho Congo pode ser um dos motivos que levaram a uma maior fitotoxicidade (Tabela 5). Algumas outras variações da molécula de benzeno, incluindo a molécula simples sem ramificações, também foram reportadas como sendo possíveis compostos intermediários da degradação de corantes azo, como o Preto Mordente 11 (TAHIR & YASMIN, 2021).

O ácido benzóico foi registrado no TR 5,3 min, nas duas concentrações de corante (Figuras 12B e 13B). Essa molécula é um dos principais produtos de baixa massa molecular formados após a clivagem de corantes azo que possuem naftaleno na sua

composição química, como o Vermelho Congo (SINHA & OSBORNE, 2016; ZHU *et al.*, 2012). O naftaleno é um dos compostos chave na degradação do corante azo e devem ser observados todos os possíveis produtos da sua clivagem (SHANMUGAN *et al.*, 2017), como o ftalato registrado no TR 12,5 min, das duas concentrações (Figuras 12 J e 13M). Essa molécula pode ser transformada em diferentes ácidos graxos e aldeídos, entrando em reações de β oxidação, produzindo NADH_2 e FADH_2 , chegando até na produção de ATP (AJAZ *et al.*, 2019). A molécula de ftalato encontrada pertence a uma classe chamada ésteres de ácido ftálico, que podem ser sintetizados artificialmente ou produzidos por plantas e micro-organismos. Essas moléculas sintéticas são conhecidas como potencialmente perigosas para o ecossistema em que são descartadas, podem interferir no processo metabólico de plantas, e as naturais, produzidas por outras plantas, possuem efeito alelopático (KUMARI & KAUR, 2020; HUANG *et al.*; 2021). A presença de um éster de ácido ftálico nos ensaios do fungo *Pholiota cf. baeosperma* 344 pode ser um dos fatores que levou a uma maior fitotoxicidade na concentração de 100 mg/L do corante Vermelho Congo (Tabela 5), podendo haver uma produção maior dessa molécula quando comparado com a menor concentração de corante utilizada.

No TR 5,4 min da concentração de 50 mg/L foi detectado um possível precursor do ácido tartárico (Figura 12C), um dos ácidos carboxílicos alifáticos lineares que são encontrados no processo de degradação do Vermelho Congo, sendo produtos da degradação de intermediários aromáticos mais complexos (SOLANO *et al.*, 2015).

Um éster derivado do ácido sulfúrico foi detectado no TR 7,8 min no ensaio com 50 mg/L (Figura 12E) e nos TR 5,5 e 8 min no ensaio com 100 mg/L (Figura 13C e 13F). A presença de ésteres provenientes de ácido sulfúrico, semelhantes aos encontrados nas análises de GC-MS do bioensaio com Vermelho Congo, já foi reportada como sendo relacionada a degradação do azocorante Acid Blue 113 (SHANMUGAM *et al.*, 2017). Além disso, a presença de um ácido sulfúrico é também um indicativo de rota de degradação do corante, por ser um dos precursores do ácido oxálico, que aparece no TR 9,2 min da concentração 50 mg/L (Figura 12H) e nos TR 8,2 min e 9,2 min da concentração 100 mg/L (Figura 13G). O ácido oxálico é o principal ácido carboxílico de cadeia curta gerado como produto oxidativo do processo de degradação do Vermelho Congo (SOLANO *et al.*, 2015). O ácido oxálico é outro metabólito fitotóxico (CHAVES *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2012), mais um componente para a fitotoxicidade presente nos ensaios com o fungo *Pholiota cf. baeosperma* 344 (Tabela 5), com maior número de

picos na concentração de 100 mg/L do corante, o que pode explicar a maior toxicidade nesse caso.

No TR 8,3 min, nas duas concentrações, foi registrada uma molécula ramificada de fenol (Figuras 12F e 13H). Diversas moléculas que possuem fenol em sua composição podem ser intermediárias no processo de degradação de corantes azo, como o Vermelho Congo e o Mordant Black 11 (KISHOR *et al.*, 2021; TAHIR & YASMIN, 2021). Essa molécula também possui ação alelopática quando produzida naturalmente por plantas (CHUAH *et al.*, 2016). A sua presença no bioensaio pode ser mais um indicativo para a fitotoxicidade observada (Tabela 5). Uma outra molécula fenólica complexa foi registrada no TR 8,8 min da concentração de 50 mg/L (Figura 12G), sendo a mesma já documentada por análises de GC-MS de efluentes têxteis tratados com lacases provenientes de fungos de podridão branca e em tratamentos com bactérias (SELVAKUMAR & SANKAR, 2016; GOWRI *et al.*, 2020). Os dois isolados representantes da espécie *Pholiota cf. baeosperma* (320 e 344) são classificados como fungos de podridão branca e demonstraram a maior produção de lacase nos ensaios realizados (Tabela 6), o que é mais um indicativo que corrobora a hipótese de que houve degradação do corante Vermelho Congo por esses fungos.

O pico no TR 11,2 min, nas duas concentrações (Figuras 12I e 13L), é referente ao ácido tetradecanóico, que pode ser produto de uma descarboxilação do ácido hexadecanóico. Segundo Shanmugam *et al.* (2017), o ácido hexadecanóico é um dos ácidos graxos resultantes da degradação de corantes azo. Ácidos graxos de cadeia intermediária, como os encontrados no ensaio, podem apresentar fitotoxicidade, entretanto, em estudos de Fukuda *et al.* (2004), o ácido mirístico (ou tetradecanóico), não afetou as espécies vegetais testadas, incluindo o *Cucumis sativus*. Para os demais ácidos graxos não há informação quanto a sua fitotoxicidade. Outro ácido graxo (octadecanóico) foi registrado no TR 15,388 (Figura 12L) da concentração de 50 mg/L. Esse ácido graxo saturado já foi identificado como sendo um possível fragmento intermediário da degradação de Vermelho Congo (MUNEER *et al.*, 2019). Por fim, o último composto alvo encontrado nas análises do bioensaio conduzido com o fungo *Pholiota cf. baeosperma* 344 na concentração de 50 mg/L foi o ácido palmítico (ou ácido hexadecanóico) que foi detectado no TR 13,4 min (Figura 12K), mais um ácido graxo saturado que é um dos metabólitos finais da degradação de corantes azo (SHANMUGAM *et al.*, 2017). Na concentração de 100 mg/L também apareceu um éster de ácido acético

no TR 8,6 (Figura 13J), um derivado do ácido carboxílico de cadeia curta, já reportado como um produto intermediário da quebra de compostos aromáticos na degradação do corante Vermelho Congo (SOLANO *et al.*, 2015. TAHIR & YASMIN, 2021).

Todos os compostos citados anteriormente dão suporte à hipótese de que o fungo basidiomiceto de origem Antártica *Pholiota cf. baeosperma* 344 está promovendo a biodegradação do corante têxtil Vermelho Congo, em ambas as concentrações testadas. Entretanto, não foi possível estabelecer uma rota metabólica, com as prováveis enzimas atuantes, pois todos os compostos encontrados são das etapas finais do metabolismo do vermelho congo, não tendo sido detectados compostos intermediários mais específicos como aminas e com ligações azo que poderiam revelar um panorama mais amplo do processo biodegradativo. O período de incubação do ensaio pode ter sido um fator determinante nessa análise, tendo em vista a detecção de compostos das etapas finais do metabolismo do corante utilizado após sete dias de incubação. Desta forma, o acompanhamento diário da degradação pela técnica de GC-MS poderá auxiliar no entendimento da rota metabólica de degradação do Vermelho Congo por esse fungo.

Além dos possíveis produtos de degradação do corante, foram encontrados outros compostos que não estavam presentes no controle (sem a adição do fungo). Um deles foi o heptanol, nos TR 5,7 e 8,4 min da concentração 100 mg/L (Figura 13D) e no TR 5,7 min de 50 mg/L (Figura 12D). O heptanol é um álcool produzido por fungos basidiomicetos em meio de cultura, é volátil e responsável por produzir odor fraco e gorduroso (ABRAHAM & BERGER, 1994; SAWOSZCZUK, SYGUŁA-CHOLEWIŃSKA & HOYO-MELÉNDEZ, 2015). Um outro composto volátil registrado no TR 6,8 min, apenas na concentração de 100 mg/L (Figura 13E), foi o octano, também considerado produto de metabolismo de fungos basidiomicetos (KAMINSKI, STAWICKI & WASOWICZ, 1974).

Por fim, no ensaio com 100 mg/L no TR 9,1 min foi registrada uma molécula nitrogenada complexa (Figura 13K), que não foi encontrada na literatura, mas poderia ser um produto da degradação do Vermelho Congo, na porção da molécula onde há o encontro da ligação diazo com o naftaleno.

Quatro picos originalmente presentes nas duas concentrações do controle (experimento sem adição dos fungos), não apareceram nos espectros dos bioensaios com *Pholiota cf. baeosperma* 344 (Figuras 12 e 13). As quatro moléculas (hexadecanamida,

éster de ácido octadecanóico e hexadecanóico. 9-octadecanamida) podem ser resultantes da degradação fotolítica do corante e, o menor teor delas após o tratamento, indica a possível quebra das mesmas em compostos menos complexos (SHABAN *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2020). A molécula do éster de ácido hexadecanóico, em especial, é um forte indício desse fenômeno, já que nos bioensaios com *Pholiota cf. baeosperma* 344 foram encontrados outros ácidos que poderiam ser resultado de descarboxilação da molécula (SHANMUGAM *et al.*, 2017).

O fungo *Schizophyllum* sp. 58 apresentou um espectro muito semelhante ao do controle (Figuras 14 e 15). Entretanto, algumas moléculas nitrogenadas foram de interesse, pois foram geradas após o bioensaio e outras moléculas tiveram um aumento após o biotratamento. A primeira delas, o pirrol, registrado no TR 13,2 min, na concentração 50 mg/L (Figura 14A) e no TR 12 min, na concentração 100 mg/L (Figura 15C). Essa molécula pode ser um produto da degradação do n-butil-etilenodiamina, um dos principais compostos da degradação de corantes azo (SHANMUGAM *et al.*, 2017). Além disso, esse metabólito pode ser usado como substrato no metabolismo de amino ácido, levando à produção de acetil-CoA (AJAZ *et al.*, 2019). Na concentração de 100 mg/L, no TR 4,7 detectou-se o ácido butanoico (Figura 15A), que pode ser um dos compostos finais da degradação de corantes azo a partir da via do glutamato, gerando o pirrol (SHANMUGAM *et al.*, 2017).

Figura 14 – Compostos detectados por GC-MS do isolado *Schizophyllum* sp. 58 após incubação por 7 dias a 25 °C e 120 rpm na presença do corante Vermelho Congo (concentração de 50 mg/L). A: Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-metilpropil); B: hexadecanamida; C: 9-octadecanida; D: octadecanamida; E: ácido hexadecanóico, 2-hidroxi-1-(hidroximetil)etil éster. Em azul os compostos de degradação e em verde os compostos naturais de basidiomicetos. A linha azul indica o controle, e a preta o bioensaio.

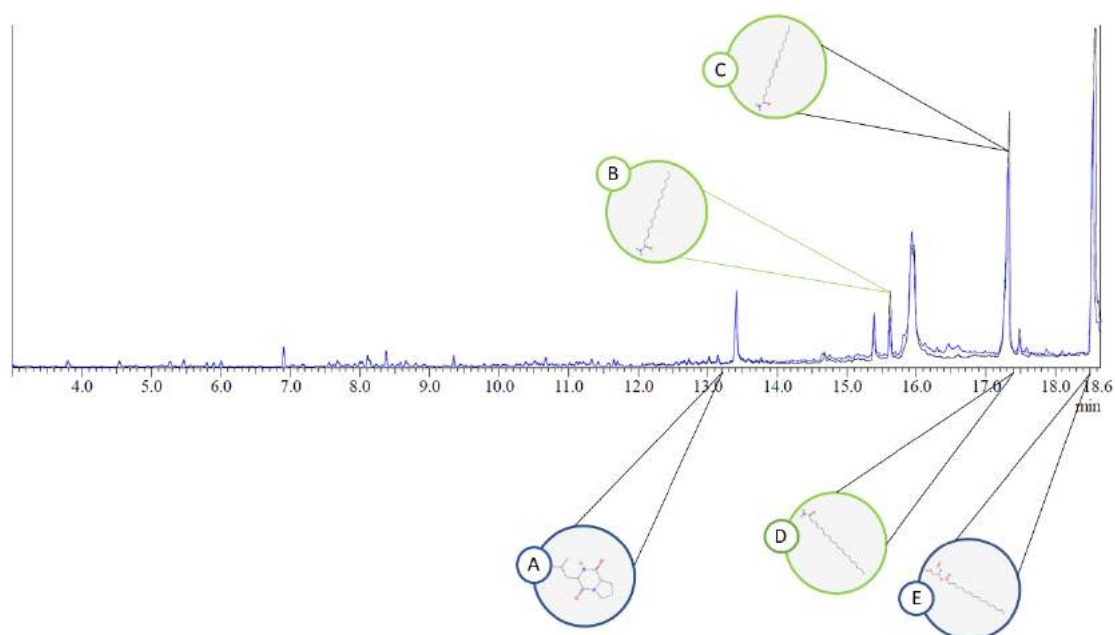
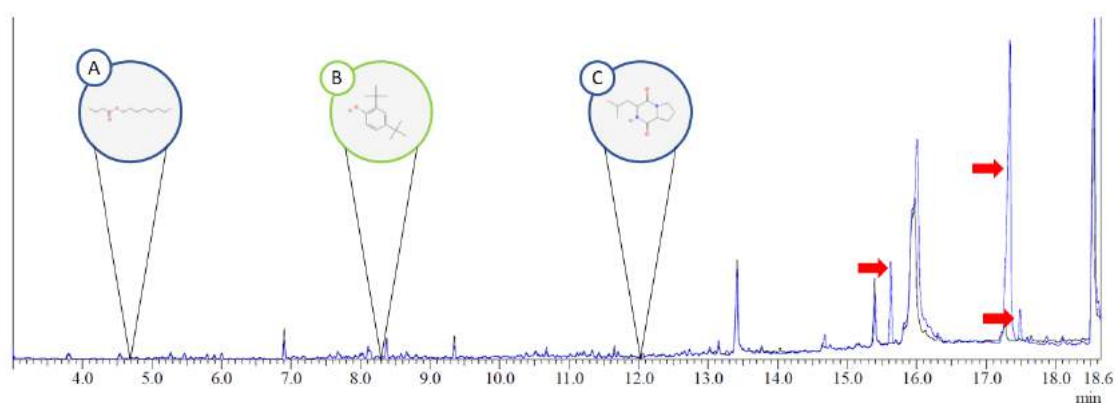


Figura 15 – Compostos identificados por GC-MS do isolado *Schizophyllum* sp. 58 após incubação por 7 dias a 25 °C e 120 rpm na presença do corante Vermelho Congo (concentração de 100 mg/L). A: ácido butanoico, octyl ester; B: fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil); C: Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-metilpropil)-. Em azul os compostos de degradação e em verde os compostos naturais de basidiomicetos. As setas vermelhas indicam picos que foram detectados apenas no controle. A linha azul indica o controle, e a preta o bioensaio.



Em comparação com o controle, observa-se o aumento de três amidas no bioensaio com 50 mg/L de corante: hexadecanamida, 9-octadecanamida e octadecanamida, nos TR 15,6, 17,3 e 17,4 min (Figura 14B, 14C, 14D) respectivamente. Todas elas já foram registradas como compostos orgânicos sintetizados por fungos, responsáveis por prover atividade antimicrobiana e larvicida natural (NASIDI, 2019). Além disso, compostos nitrogenados são comumente encontrados em extrações de metabólitos do fungo *Schizophyllum commune* com cloreto de etila (MAYAKRISHNAN

et al., 2013). Entretanto, a presença das moléculas de *pyrrol* e 9-octadecanamida no mesmo ensaio podem ser indicativos da ação da enzima lignina peroxidase (LIU *et al.*, 2020).

Na concentração de 100 mg/L de corante apareceu também uma molécula de fenol (Figura 15B) (TR 8,3), já indicada como um dos possíveis compostos resultantes da dessulfanização e desnitrificação enzimática de corantes azo (TAHIR & YASMIN, 2021). Essa mesma molécula também foi detectada nos ensaios com o fungo *Pholiota cf. baeosperma* 344. Com ação alelopática reportada em literatura (CHUAH *et al.*, 2016), a presença dessa molécula na concentração de 100 mg/L pode ser um dos motivos da maior fitotoxicidade observada no ensaio com o *Schizophyllum* sp. 58 em comparação com o bioensaio na concentração de 50 mg/L (Tabela 5). Além disso, três picos do controle não foram detectados no espectro após o tratamento (Figura 15): hexadecanamida (TR 15,6), 9-octadecanamida (TR 17,3) e octadecanamida (TR 17,4). Assim como no caso do fungo *Pholiota cf. baeosperma* 344, essas moléculas podem ser resultantes da degradação fotolítica do corante e, o menor teor delas após o tratamento, uma possível quebra dessas moléculas em compostos menos complexos (SHABAN *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2020).

Ao contrário das análises de GC-MS dos bioensaios com o fungo *Pholiota cf. baeosperma* 344, o *Schizophyllum* sp. 58 não apresentou indícios suficientes que indicassem a biodegradação do corante Vermelho Congo, o que está de acordo com os resultados de adsorção apresentados por esse isolado, podendo ser esse o principal mecanismo de descoloração do Vermelho Congo utilizado por este fungo. Entretanto, algumas moléculas detectadas, como o *pyrrol* (Figura 14A e 15C) e o ácido butanoico (Figura 15A), também apontam para uma possível degradação por ação enzimática, podendo indicar que os ensaios para detecção de atividade das enzimas ligninolíticas não tenha sido feito nas condições ideais para o *Schizophyllum* sp. 58.

5.5. Capacidade de crescimento na presença de óleo diesel

Com base nos resultados de destoxificação e adsorção do corante têxtil Vermelho do Congo, foram selecionados três fungos basidiomicetos (*Schizophyllum* sp. 58, *Pholiota cf. baeosperma* 320 e *Pholiota cf. baeosperma* 344) para os experimentos de

degradação do óleo diesel. Os fungos foram cultivados em diferentes meios de cultivo e o crescimento (produção de biomassa) foi visualmente avaliada.

Os resultados revelaram que apenas o fungo *Schizophyllum* sp. 58 foi capaz de crescer em meio contendo apenas o diesel como fonte de carbono (Tabela 7). Para os outros dois basidiomicetos (*Pholiota* cf. *baeosperma* 320 e 344) foi necessário fonte adicional de carbono. Considerando esses resultados, o Meio 3 (composto por MM acrescido de 1 g/L peptona, 5 g/L de malte e 0,1 g/L de glicose) foi selecionado e poderá ser utilizado em estudos futuros de degradação e destoxificação do óleo diesel.

Tabela 7 - Crescimento micelial em diferentes meios de cultura acrescidos com 2% de diesel. M1: Meio Mínimo Mineral (MM); M2: MM + 0,1 g/L de glicose; M3: MM +1 g/L peptona, 5 g/L de malte e 0,1 g/L de glicose. +++: alta produção de micélio; ++: produção intermediária de micélio; +: pouca produção de micélio; -: sem produção de micélio.

Fungo	Código isolado	Dias	Controle	M1	M2	M3
<i>Schizophyllum</i> sp.	58	7	+++	++	++	+++
		14	+++	++	++	+++
<i>Pholiota</i> cf. <i>baeosperma</i>	320	7	+++	-	-	+
		14	+++	-	-	++
<i>Pholiota</i> cf. <i>baeosperma</i>	344	7	+++	-	-	++
		14	+++	-	-	++

Fungos basidiomicetos possuem a capacidade de suportar a presença de petróleo e seus derivados, especialmente na presença de uma fonte de carbono adicional, como a glicose. A adição de outra fonte de nutrientes pode ser um estímulo inicial no crescimento micelial, que passa então a degradar o composto xenobiótico, como relatado por Jokharidze, Kachlishvili & Elisashvili (2019). Nesse estudo também foi observada a produção de lacase, assim como no estudo de Wen *et al.* (2011), que enfatizam o estímulo na produção dessa enzima e a melhora nos resultados de degradação de HPA (Hidrocarboneto Policíclico Aromático), um dos principais componentes do óleo diesel, quando há adição de outros substratos no tratamento. No presente estudo, os fungos utilizados (*Schizophyllum* sp. 58 e *Pholiota* cf. *baeosperma* 320 e 344) também se mostraram capaz de produzir essa enzima, o que pode ser um indício de possibilidade de degradação do óleo diesel. Gu *et al.* (2022), em estudos de degradação de HPA por basidiomicetos e bactérias comprovou que a bioestimulação é uma estratégia eficaz para

a mineralização e o cometabolismo enzimático desse composto. Harms, Schlosser & Wick (2011) também apontaram a capacidade de basidiomicetos de usarem exoenzimas oxidativas não-específicas para mineralizar uma vasta gama de químicos, através de cometabolismo.

O fungo *Schizophyllum commune* foi identificado como capaz de degradar não somente componentes do óleo diesel, chegando até 75 % de efetividade, como também de gasolina, hidrocarbonetos totais de petróleo e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (SHARMA, HARSH & VARSHNEY, 2019). *Schizophyllum* sp. 58 foi o único dos fungos estudados capaz de apresentar crescimento micelial no ensaio sem adicional de fonte de carbono, com apenas o diesel e o meio mineral, o que pode ser um indicativo da possível ação degradadora desse fungo.

A Antártica, assim como os outros continentes, também conta com poluição por hidrocarbonetos complexos, como o diesel. Deelaman *et al.* (2020) relataram a presença de HPAs no solo da Ilha Rei George, listando como prováveis fontes os geradores de eletricidade e gasolina de veículos pequenos. Por ser um ambiente com condições muito específicas (baixas temperaturas, oligotrofia, extremamente seco) a melhor alternativa biológica para lidar com esses compostos xenobióticos no local seria utilizando micro-organismos nativos, que estão adaptados às condições adversas da Antártica. Estudos relacionados com a utilização da comunidade microbiológica marinha da Antártica em derramamento de óleo no mar pelos navios utilizados nas pesquisas foram reportados por Zakaria *et al.* (2021a) e Zakaria *et al.* (2021b). Quanto às contaminações de solo, como a que ocorreu na Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF), Jurelevicius *et al.* (2022) estudaram a composição bacteriana dos locais contaminados próximos da EACF e comprovaram a capacidade de biorremediação de hidrocarbonetos por esses micro-organismos.

Considerando o potencial enzimático para degradação de hidrocarbonetos dos fungos basidiomicetos e os resultados obtidos no presente trabalho, estudos futuros com os basidiomicetos antárticos na biorremediação de óleo diesel devem ser estimulados.

6. Conclusões

A metodologia utilizada para o aprofundamento da identificação taxonômica (novos marcadores moleculares) dos basidiomicetos da Antártica foi eficaz, permitindo avanços na identificação de três dos quatro fungos estudados. Os isolados 320 e 344, previamente identificados como *Pholiota* sp. foram relacionados a espécie *P. baeosperma*. O isolado 177, anteriormente identificado apenas no nível de Ordem (Russulales), foi identificado como pertencente ao gênero *Aleurodiscus*. Para o isolado 58, foi possível apenas confirmar o gênero, mas com a perspectiva de estar entre as espécies *S. commune* e *S. radiatum*.

Os quatro fungos basidiomicetos estudados apresentam produção da enzima ligninolítica lacase quando cultivados na presença do corante têxtil Vermelho Congo, com destaque para os isolados *Pholiota* cf. *baeosperma* 320 e 344. Esses resultados evidenciam o potencial desses fungos para aplicação industrial e ambiental.

Os melhores resultados de descoloração do Vermelho Congo (acima de 90%) foram observados para o fungo *Pholiota* cf. *baeosperma* 320 e *Schizophyllum* sp. 58. Os resultados do estudo da cinética de descoloração, revelaram três comportamentos distintos: *Schizophyllum* 58 alcançou um máximo de descoloração no sétimo dia do experimento; *Pholiota* cf. *baeosperma* 320 e 344 apresentaram uma média de 70% de descoloração desde o primeiro dia do experimento; *Aleurodiscus* sp. 177 apresentou uma diminuição de 10 % na descoloração no sétimo dia do experimento. No geral, esses fungos foram capazes de diminuir a toxicidade do meio quando a concentração de 50 mg/L foi utilizada. Na maior concentração do corante (100 mg/L), *Aleurodiscus* sp. 177 e *Pholiota* cf. *baeosperma* 320 e 344 apresentaram aumento na toxicidade. Esses resultados demonstram diferentes mecanismos de atuação dos fungos estudados frente ao cultivo dos mesmos na presença de um composto xenobiótico e tóxico. Além disso, para uma completa mineralização desses subprodutos tóxicos, mais dias de tratamento podem ser necessários.

Todos os isolados apresentaram adsorção do corante pelo micélio fúngico. Os resultados indicam que este pode ser o principal mecanismo de descoloração utilizado pelo fungo *Aleurodiscus* sp. 177. Para o fungo *Schizophyllum* sp. 58, não houve diferença significativa entre os ensaios com o micélio ativo e inativo. Para os fungos *Pholiota* cf. *baeosperma* 320 e 344, a adsorção pelo micélio inativo foi menor do que no ensaio com os fungos ativos, indicando possível ação enzimática na descoloração.

A avaliação dos metabólitos gerados no processo de degradação do Vermelho Congo por GC-MS, indicaram a presença de compostos fitotóxicos como o éster de ácido ftálico, ácido oxálico e benzeno, que podem estar na rota de degradação do corante pelo metabolismo do fungo *Pholiota* cf. *baeosperma* 344. Esses resultados corroboram a detecção de maior fitotoxicidade nos experimentos na concentração de 100 mg/L de corante para esse fungo. Nos experimentos com o fungo *Schizophyllum* sp. 58, apesar do espectro obtido ter sido muito semelhante ao do controle, possíveis metabólitos de degradação do corante (pyrrol, fenol e ácido butanoico) também foram identificados. Este fungo, foi o único capaz de crescer (produzir biomassa) em meio mineral mínimo contendo óleo diesel como única fonte de carbono, ressaltando o seu potencial para degradação de poluentes ambientais.

Os resultados do presente estudo revelam que os fungos basidiomicetos provenientes de solo de recuo de geleira Antártica podem ser considerados como novos recursos microbianos para utilização em processos de biorremediação. Por pertencerem a um grupo de fungos raramente isolados em amostras Antárticas, o estudo mais aprofundado de suas enzimas e metabolismo envolvido com a degradação de azocorantes poderão resultar em inovação científica e tecnológica.

Referências bibliográficas

- ABDULRASHEED, M.; ZAKARIA, N. N.; ROSLEE, A. F. A.; SHUKOR, M. Y.; ZULKHARNAIN, A.; NAPIS, S.; CONVEY, P.; ALIAS, S. A.; GONZALEZ-ROCHA, G.; AHMAD, S. A. Biodegradation of diesel oil by cold-adapted bacterial strains of *Arthrobacter* spp. from Antarctica. **Antarctic Science**, p.1–13, 2020.
- ABRAHAM, B. G.; BERGER, R. G. Higher fungi for generating aroma components through novel biotechnologies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, n.10, pp.2344-2348, 1994.
- ADEOYE, O. J.; AINA, S. A. An appraisal of ozone layer depletion and its implication on the human environment. **Journal of Law, Policy and Globalization**, v.83, 2019.
- AHMED, F.; FAKHRUDDIN, A. N. M. A review on environmental contamination of petroleum hydrocarbons and its biodegradation. **Environmental Sciences & Natural Resources**, v. 11, n. 3, 2018.
- AJAZ, M.; REHMAN, A.; KHAN, Z.; NISAR, M. A.; HUSSAIN, S. Degradation of azo dyes by *Alcaligenes aquatilis* 3c and its potential use in the wastewater treatment. **AMB Express**, v.9, n.64, 2019.
- ALMEIDA, A. P.; MACRAE, A.; RIBEIRO, B. D.; NASCIMENTO, R. P. Decolorization and detoxification of different azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* ME-446 under submerged fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.52, pp. 727-738, 2021.
- ARENZ, B. E.; BLANCHETTE, R. A. Distribution and abundance of soil fungi in Antarctica at sites on the Peninsula, Ross Sea Region and McMurdo Dry Valleys. **Soil Biology and Biochemistry**, v.43, pp.308-315, 2011.
- ARORA, D. S.; GILL, P. K. Comparison of two assays procedures for lignin peroxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, n7-8, pp. 602-605, 2001.
- ASSES, N.; AYED, L.; HKIRI, N.; HAMDI, M. Congo red decolorization and detoxification by *Aspergillus niger*: removal mechanisms and dye degradation pathway. **BioMed Research International**, 3049686, 2018.
- BARGHINI, P.; PASQUALETTI, M.; GORRASI, S.; FENICE, M. Bacteria from the “Saline di Tarquinia” marine salterns reveal very atypical growth profiles with regards to salinity and temperature. **Mediterranean Marine Science**, v. 19. n. 3, 2018.
- BENKHAYA, S.; M'RABET, S.; HARFI, A. E. A review on classifications, recent synthesis and applications of textile dyes. **Inorganic Chemistry Communications**, v.115, 107891, 2020.
- BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Persistence and impact of steroidal estrogens on the environment and their laccase-assisted removal. **Science of the Total Environment**, v.690, pp.447-459, 2019.
- BILAL, M.; RASHEED, T.; NABEEL, F.; IQBAL, H. M. N.; ZHAO, Y. Hazardous contaminants in the environment and their laccase-assisted degradation: a review. **Journal of Environmental Management**, v.234, pp.253-264, 2019.
- BÖLTER, M.; BEYER, L.; STONEHOUSE, B. Antarctic Coastal Landscapes: Characteristics, Ecology and Research. In: BEYER, L.; BÖLTER, M. **Geocology of Antarctic Ice-free coastal landscapes**. Berlin: Springer-Verlag, v. 154, pp. 5-21, 2002.
- BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; SETTE, L. D. The Production of Ligninolytic Enzymes by Marine-Derived Basidiomycetes and Their Biotechnological Potential in

- the Biodegradation of Recalcitrant Pollutants and the Treatment of Textile Effluents. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 223, n. 5, p. 2333–2345, 2012.
- BONUGLI-SANTOS, R. C.; VASCONCELOS, M. R. S.; PASSARINI, M. R. Z.; VIEIRA, G. A. L.; LOPES, V. C. P.; MAINARDI, P. H.; SANTOS, J. A.; DUARTE, L. A.; OTERO, I. V. R.; YOSHIDA, A. M. S.; FEITOSA, V. A.; PESSOA JR, A.; SETTE, L.D. Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. **Frontiers in Microbiology (Online)**, v. 6, p. 269, 2015.
- BONUGLI-SANTOS, R. C., VIEIRA, G. A. L., COLLINS, C., FERNANDES, T. C. C., MARIN-MORALES, M. A., MURRAY, P., SETTE, L. D. Enhanced textile dye decolorization by marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063 using integrated statistical design. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 9, p. 8659–8668, 2016.
- BRADLEY, J. A.; SINGARAYER, J. S.; ANESIO, A. M. Microbial Community dynamics in the forefield of glaciers. **Proceedings of the Royal Society B**, v.281, 20140882, 2014.
- BUSWELL J.K.; CAI Y.J.; CHANG S.T. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula* (*Lentinus*) edodes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, n. 1, pp. 81-88, 1995.
- CAO, Y.; LI, P.; ZHAO, J.; WANG, H.; JEEWON, R.; BHOORYROO, V.; ARUNA, B.; LIN, F.; WANG, Q. Morph-molecular characterization of the *Meira nicotianae* sp. nov., a novel basidiomycetous, anamorphic yeast-like fungus associated with growth improvement in tobacco plant. **Phytotaxa**, v.365, n.2, pp.169-181, 2018.
- CARREÑO-RUIZ, S. D.; LÁZARO, A. A. A.; GARCÍA, S. C.; HERNÁNDEZ, R. G.; CHEN, J.; NAVARRO, G. K. G.; FAJARDO, L. V. G.; PÉREZ, N. C. J.; CRUZ, M. T.; BLANCO, J. C.; CAPPELLO, R. E. New record of *Schizophyllum* (*Schizophyllaceae*) from Mexico and the confirmation of its edibility in the humid tropics. **Phytotaxa**, v. 412, n2, pp.137-148, 2019.
- CHAVES, N.; SOSA, T.; ALÍAS, J. C.; ESCUDERO, J. C. Identification and effects of interaction phytotoxic compounds from exudate of *Cistus ladanifer* leaves. **Journal of Chemical Ecology**, v.27, n.3, 2001.
- CHEQUER, F. M. D.; OLIVEIRA, G. A. R.; FERRAZ, E. R. A.; CARDOSO, J. C.; ZANONI, M. V. B.; OLIVEIRA, D. P. Textile dyes: dyeing process and environmental impact. In: GUNAY, M. **Eco-friendly textile dyeing and finishing**. Reino Unido: IntechOpen, pp. 155-175, 2013.
- CHOI, Y.; NGUYEN, H. T.; LEE, T. S.; KIM, J. K.; CHOI, J. Genetic diversity and dye-decolorizing spectrum of *Schizophyllum commune* population. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.30, n.10, pp.1525-1535, 2020.
- CHOWDHARY, A.; RANDHAWA, H. S.; GAUR, S. N.; AGARWAL, K.; KATHURIA, S.; ROY, P.; KLAASSEN, C. H.; MEIS, J. F. *Schizophyllum commune* as an emerging fungal pathogen: a review and report of two cases. **Mycoses**, v.56, n.1, pp.1-10, 2013a.
- CHOWDHARY, A.; KATHURIA, S.; SINGH, P. K.; AGARWAL, K.; GAUR, S. N.; ROY, P.; RANDHAWA, H. S.; MEIS, J. F. Molecular characterization and in vitro antifungal susceptibility profile of *Schizophyllum commune*, an emerging basidiomycete in bronchopulmonary mycoses. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n.6, pp. 2845-2848, 2013b.
- CHUAH, T. S.; NORHAFIZAH, M., Z.; NAIMAH, A. H.; ISMAIL, B. S. Phytotoxic activity of the allelochemical, 2,4-di-tert-butylphenol on two selected weed species. **Sains Malaysiana**, v.45, n.6, pp.963-967, 2016.

- DAS, K., DOWIE, N. J.; LI, G.J.; MILLER, S. L. Two new species of *Russula* (Russulales) from India. **Mycosphere**, v.5, n.5, pp. 612-622, 2014.
- DEELAMAN, W.; PONGPIACHAN, S.; TIPMANEE, D.; SUTTINUN, O.; CHOOCHUAY, C.; IADTEM, N.; CHAROENKALUNYUTA, T.; PROMDEE, K. Source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons in the terrestrial soils of King George Island, Antarctica. **Journal of South American Earth Sciences**, v.104, 102832, 2020.
- DIÓGENES, A. Empresa terá que reparar danos ambientais por vazamento de óleo diesel, 2014. Disponível em: <https://www.campograndenews.com.br/cidades/interior/empresa-tera-que-reparar-danos-ambientais-por-vazamento-de-oleo-diesel> Acesso em: 31 de maio de 2019.
- DUARTE, A.W.F; DOS SANTOS J.A.; VIANNA M.V.; VIEIRA J.M.F.; MALLAGUTTI V.H.; INFORSATO F.J.; WENTZEL L.C.P.; LARIO L.D.; RODRIGUES A.; PAGNOCCA F.C.; PESSOA J. A.; DURÃES S. L. Cold-adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.38, n.4, 2018.
- DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, pp. 907–931, 2002.
- DURÁN, P.; BARRA, P. J.; JORQUERA, M. A.; VISCARDI, S.; FERNANDEZ, C.; PAZ, C.; MORA, M. L.; BOL, R. Occurrence of soil fungi in Antarctic Pristine Environments. **Frontier in Bioengineering and Biotechnology**, v.7, article 28, 2019.
- ELLEN MACARTHUR FOUNDATION. A new textiles economy: redesigning fashion's future. 150p. 2017.
- ENSHASY, H. E.; AGOULLAL, F.; MAT, Z.; MALEK, R. A.; HANAPI, S. Z.; LENG, O. M.; DAILIN, D. J.; SUKMAWATI, D. Pleurotus ostreatus: a biofactory for lignin-degrading enzymes of diverse industrial applications. In: YADAV, A. N.; SINGH, S.; MISHRA, S.; GUPTA, A. **Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi: fungal biology**. Suíça: Springer, pp. 101-152, 2019.
- FIERER, N.; NEMERGUT, D.; KNIGHT, R.; CRAINE, J. M. Changes through time: integrating microorganisms into the study of succession. **Research in Microbiology**, v.161, n.8, pp.643-642, 2010.
- FONTES, B. J.; KLEINGESINDS, E. K.; GIOVANELLA, P.; JÚNIOR, A. P.; SETTE, L. D. Laccase produced by *Peniophora* from marine and terrestrial origin: a comparative study. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.35, 102066, 2021.fontes
- FULLER, R. J. M.; JOHNSTON, P. R.; PEARSON, M. N. *Schizophyllum commune*: a case study for testing the potential introduction of non-native strains into New Zealand. **New Zealand Journal of Botany**, v.51, n.4, pp.286-296, 2013.
- FUKUDA, M.; TSUJINO, Y.; FUJIMORI, T.; WAKABAYASHI, K. BÖGER, P. Phytotoxic activity of middle-chain fatty acids I: effects on cell constituents. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.80, pp.143-150, 2004.
- GAN, D.; MA, L.; JIANG, C.; XU, R.; ZENG, X. Production, preliminary characterization and antitumor activity *in vitro* of polysaccharides from the mycelium of *Pholiota dinghuensis* Bi. **Carbohydrate Polymers**, v.84, pp.997-1003, 2011.
- GERARDO, N. M.; MUELLER, U. G.; PRICE, S. L.; CURRIE, C. R. Exploiting a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus-growing ants symbiosis. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 271, pp.1791-1798, 2004.

- GIOVANELLA, P.; VIEIRA, G. A. L.; RAMOS, O. I. V.; PAIS, P. E.; DE JESUS, F. B.; SETTE, L.D. Metal and organic pollutants bioremediation by extremophile microorganisms. **Journal of Hazardous Materials**, v.15, n.382, 121024, 2020.
- GONZÁLEZ-RAMÍREZ, M.; GAVILÁN, J.; SILVA-GRECCHI, T.; CAJAS-MADRIAGA, D.; TRIVIÑO, S.; BECERRA, J.; SAEZ-ORELLANA, F.; PÉREZ, C.; FUENTEALBA, J. A natural benzofuran from Patagonic *Aleurodiscus vitellinus* fungus has potent neuroprotective properties on a cellular model of amyloid- β peptide toxicity. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.61, pp.1463-1475, 2018.
- GORJÓN, S. P.; GRESLEBIN, A. G.; RAJCHENBERG, M. The genus *Aleurodiscus* s. l. (Stereaceae, Russulales) in the Patagonian Andes. **Mycology Progress**, v.12, pp.12-108, 2013.
- GOWRI, A. K.; KARUNAKARAN, M. J.; MUTHUNARAYANAN, V.; RAVINDRAN, B.; NGUYEN-TRI, P.; NGO, H. H.; BUI, X. T.; NGUYEN, X. H.; NGUYEN, D. D.; CHANG, S. W.; CHANDRAN, T. Evaluation of bioremediation competence of indigenous bacterial strains isolated from fabric dyeing effluent. **Bioresource Technology Reports**, v.11, 100536, 2020.
- GU, D.; XIANG, X.; WU, Y.; ZENG, J.; LIN, X. Synergy between fungi and bacteria promotes polycyclic aromatic hydrocarbon cometabolism in lignin-amended soil. **Journal of Hazardous Material**, v.425, 127958, 2022.
- HARMS, H.; SCHLOSSER, D.; WICK, L. Y. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. **Nature Reviews Microbiology**, v.9, pp.177-192, 2011.
- HATTAKA, A. Lignin-modifying enzymers from selected white-rot fungi: production and role in lignina degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, v.13, n.2-3, pp.125-135, 1994.
- HELD, B. W.; BLANCHETTE, R. A. Deception Island, Antarctica, harbors a diverse assemblage of wood decay fungi. **Fungal Biology**, v.121, pp.145-157, 2017.
- HRBÁČEK, F.; CANNONE, N.; KŇAŽKOVÁ, M.; Malfasi, F.; CONVEY, P.; GUGLIELMIN, M. Effect of climate and moss vegetation on ground surface temperature and the active layer among different biogeographical regions in Antarctica. **Catena**, v. 190, 2020.
- HUANG, R.; CHE, H. J.; ZHANG, J.; YANG, L.; JIANG, D. H.; LI, G. Q. Evaluation of *Sporidiobolus pararoseus* strain YCXT3 as biocontrol agent of Botrytis cinerea on post-harvest strawberry fruits. **Biological Control**, v.62, pp.53-63, 2012.
- HUANG, L.; ZHU, X.; ZHOU, S.; CHENG, Z.; SHI, K.; ZHANG, C.; SHAO, H. Phtalic acid esters: natural sources and biological activities. **Toxins**, v.13, n.495, 2021.
- IARK, D.; BUZZO, A. J. R.; GARCIA, J. A. A.; CÔRREA, V. G.; HELM, C. V.; CÔRREA, R. C. G.; PERALTA, R. A.; MOREIRA, R. F. P. M.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Enzymatic degradation and detoxification of azo dye Congo red by a new laccase from *Oudemansiella canarii*. **Bioresource Technology**, v.289, article 121655, 2019.
- ICHINOSE, H. Cytochrome P450 of wood rotting basidiomycetes and biotechnological applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.60, n.1, pp.71-81, 2013.
- IEMI. Brasil Têxtil 2020 – Relatório setorial da indústria têxtil brasileira. 2020.
- IMRON, M. F.; KURNIAWAN, S. B.; ISMAIL, N. I.; ABDULLAH, S. R. S. Future challenges in diesel biodegradation by bacteria isolates: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 251, 119716, 2020.

- JOKHARIDZE, T.; KACHLISHVILI, E.; ELISASHVILI, V. Biodegradation of crude oil and lignin-modifying enzyme activity of white rot basidiomycetes. **Ecological Engineering and Environment Protection**, v.1, p.26-36, 2019.
- JURELEVICIUS, D.; PEREIRA, R. S.; MOTA, F. F.; CURY, J. C.; OLIVEIRA, I. C.; ROSADO, A. S.; MASON, O. U.; JANSSON, J. K.; SELDIN, L. Metagenomic analysis of microbial communities across a transect from low to highly hydrocarbon-contaminated soils in King George Island, Maritime Antarctica. **Geobiology**, v.20, pp.98-111, 2022.
- KAIIRA, M. G.; CHEMINING, G. N.; AYUKE, F.; BAGUMA, Y.; ATWIJUKIRE, E. Allelopathic potential of compounds in selected crops. **Journal of Agricultural Science**, v.13, n.9, 2021.
- KAMINSKI, E.; STAWICKI, S.; WASOWICZ, E. Volatile flavor compounds produced by molds of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fungi imperfecti*. **Applied Microbiology**, v.27, n.6, pp.1001-1004, 1974.
- KANT, R. Textile dyeing industry an environmental hazard. **Natural Science**, v.4, n.1, pp.22-26, 2012.
- KHANDEGAR, V.; SAROHA, A. K. Electrocoagulation for the treatment of textile industry effluent—A review. **Journal of environmental management**, v. 128, pp. 949-963, 2013.
- KIISKINEN, L. L.; RÄTTÖ, M.; KRUUS, K. Screening for novel laccase-producing microbes. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, pp.640-646, 2014.
- KISHOR, R.; PURCHASE, D.; SARATALE, G. D.; FERREIRA, L. F. R.; BILAL, M.; IQBAL, H. M. N.; BHARAGAVA, R. N. Environment friendly degradation and detoxification of Congo red dye and textile industry wastewater by a newly isolated *Bacillus cohnii* (RKS9). **Environmental Technology & Innovation**, v.22, 101425, 2021.
- KNAP, W. H.; OERLEMANS, J.; CADÉE, M. Climate sensitivity of the ice cap of King George Island, South Shetland Island, Antarctica. **Annals of Glaciology**, v.23, pp.154-159, 1996.
- KOBAYASHI, H. Characterization of manganese peroxidase from *Pholiota aurevella*. 鯉淵研報, v.30, pp.16-22, 2020.
- KUMAR, S. V. S.; PHALE, P. S.; DURANI, S.; WANGIKAR, P. P. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase Family. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, n. 4, pp. 386-394, 2003.
- KUMARI, A.; KAUR, R. A review on morpho-physiological traits of plants under phthalates stress and insights into their uptake and translocation. **Plant Growth Regulation**, v.91, pp.327-347, 2020.
- LEÃO, M. M. D. Controle ambiental na indústria têxtil: acabamento de malhas. Belo Horizonte: Segrac. 356 p. 2002.
- LI, X.; JIA, R. Decolorization and biosorption for Congo red by system rice hull-*Schizophyllum* sp. F17 under solid-state condition in a continuous flow packed-bed bioreactor. **Bioresource Technology**, v.99, pp. 6885-6892, 2008.
- LI, X.; JIA, R.; LI, P.; ANG, S. Response surface analysis for enzymatic decolorization of Congo red by manganese peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, pp. 1-6, 2009.

- LI, X.; ZHANG, J.; JIANG, Y.; HU, M.; LI, S.; ZHAI, Q. Highly efficient biodecolorization/degradation of Congo red and Alizarin yellow R by chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*: catalytic mechanism and degradation pathway. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 2013.
- LIM, Z. S.; WONG, R. R.; WONG, C.; ZULKHARNAIN, A.; SHAHARUDDIN, N. A.; AHMAD, S. A. Bibliometric analysis of research on diesel pollution in Antarctica and a review on remediation techniques. **Applied Sciences**, v. 11, 1123, 2021.
- LIU, S.; XU, X.; KANG, Y.; XIAO, Y.; LIU, H. Degradation and detoxification of azo dyes with recombinant ligninolytic enzymes from *Aspergillus* sp. with secretory overexpression in *Pichia pastoris*. **Royal Society Open Science**, v. 7, 200688, 2020.
- LÓPEZ-LEGARDA, X.; ROSTRO-ALANIS, M.; PARRA-SALDIVAR, R.; VILLA-PULGARÍN, J. A.; SEGURA-SÁNCHEZ, F. Submerged cultivation, characterization and in vitro antitumor activity of polysaccharides from *Schizophyllum radiatum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.1, n.186, pp.919-932, 2021.
- LUCAS, M.; MERTENS, V.; CORBISIER, A. M.; VANHULLE, S. Synthetic dyes decolourisation by white-rot fungi: development of original microtitre plate method and screening. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, pp. 97-106, 2008.
- MADHAV, S.; AHAMAD, A.; SINGH, P.; MISHRA, P. K. A review of textile industry: wet processing, environmental impacts, and effluent treatment methods. **Environmental Quality Management**, v.27, n.3, pp.31-41, 2018.
- MADHAVI, V.; LELE, S. S. Laccase: properties and applications. **BioResources**, v.4, n.4, pp.1694-1717, 2009.
- MATHENY, P. B.; SWENIE, R. A.; MILLER, A. N.; PETERSEN, R. H.; HUGHES, K. W. Revision of pyrophilous taxa of *Pholiota* described from North America reveals four species – *P. brunnescens*, *P. castanea*, *P. highlandensis*, and *P. molesta*. **Mycologia**, v.110, n.6, pp. 997-1016, 2018.
- MAYAKRISHNAN, V.; ABDULLAH, N.; ABIDIN, M. H. Z.; FADZIL, N. H. M.; JOHARI, N. M. K.; AMINUDIN, N.; ABIDIN, N. Z. Investigation of the antioxidative potential of various solvent fractions from fruiting bodies of *Schizophyllum commune* (Fr.) mushrooms and characterization of phytoconstituents. **Journal of Agricultural Science**, v.5, n. 6, 2013.
- MEI, R.; SHI, Y.; ZHANG, S.; HU, J.; ZHU, L.; GAN, J.; CAI, L. DING, Z. Biotransformation of 1,8-dihydroxyanthraquinone into peniphenone under the fermentation of *Aleurodiscus mirabilis*. **ACS Omega**, v.5, pp.33380-33386, 2020.
- MILLER, S. L.; McCLEAN, T. M.; WALKER, J. F.; BUYCK, B. A molecular phylogeny of the Russulales including agaricoid, gasteroid and pleurotoid taxa. **Mycologia**, v.93, n.2, pp.344-354, 2001.
- MOHAMMADI, A.; SHOJAOSADATI, S. A.; TEHRANI, H. J.; MOUSAVI, S. M.; SALEH, T.; KHORASANI, A. C. Schizophyllan production by newly isolated fungus *Schizophyllum commune* IBRC-M 30213: optimization of culture medium using response surface methodology. **Annals of Microbiology**, v.68, pp.47-62, 2018.
- MÖLLER, E. M.; BAHNWEG, G.; SANDERMANN, H.; GEIGER, H. H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, v.20, n.22, pp.6115-6116, 1992.

- MÖLLER, C.; DREYFUSS, M. M. Microfungi from Antarctic lichens, mosses and vascular plants. **Mycologia**, v.88, pp.922-933, 1996.
- MUNEER, M.; SAEED, M.; BHATTI, I. A.; HAQ, A.; KHOSA, M. K.; JAMAL, M. A.; ALI, S. Radiation induced degradation of Congo red dye: a mechanistic study. **Nukleonika**, v.64, n.2, pp.49-53, 2019.
- NASIDI, A.; NAFISA, A. A.; MARYAM, S. K.; SALIHU, I. I.; UMAR, G. N.; MUHAMMAD, A.; UMAR, K. M.; BALA, M.; IMAM, A. A. Lavicidal potential of *Aspergillus terreus* conidial suspension and metabolites against *Anopheles* mosquito. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v.7, n.4, pp.1169-1173, 2019.
- NOVOTNÝ, C.; SVOBODOVÁ, K.; ERBANOVA, P.; CAJTHAML, T.; KASINATH, A.; LANG, E.; ŠAŠEK, V. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. **Soil Biology & Biochemistry**, v.36, pp.1545-1551, 2004.
- NOZAKI, K.; BEH, C. H.; MIZUNO, M.; ISOBE, T.; SHIROISHI, M.; KANDA, T.; AMANO, Y. Screening and investigation of dye decolorization activities of basidiomycetes. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 105, n.1, pp.69-72, 2008.
- OGAKI, M. B.; VIEIRA, R.; MUNIZ, M. C.; ZANI, C. L.; ALVES, T. M. A.; JUNIOR, P. A. S.; MURTA, S. M. F.; BARBOSA, E. C.; OLIVEIRA, J. G.; CERAVOLO, I. P.; PEREIRA, P. O.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Diversity, ecology, and bioprospecting of culturable fungi in lakes impacted by anthropogenic activities in Maritime Antarctica. **Extremophiles**, v. 24, pp.637-655, 2020.
- OTERO, I. V. R. Transcriptoma do fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063: análise dos genes de lacase, clonagem e expressão heteróloga. 2016. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro – SP. 2016.
- PASSARINI, M. R. Z.; RODRIGUES, M. V. N.; SILVA, M.; SETTE, L. D. Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v.62, n.2, pp.364-370, 2011.
- PEGLER, D. N.; SPOONER, B. M.; SMITH, R. I. L. Higher fungi of Antarctica, the subantarctic zone and Falkland Islands. **Kew Bulletin**, v.37, n.3, pp.499-562, 1980.
- PETSCH, C.; ROSA, K. K.; VIEIRA, R.; BRAUN, M. H.; COSTA, R. M.; SIMÕES, J. C. The effects of climatic change on glacial, proglacial and paraglacial systems at Collins Glacier, King George Island, Antarctica, from the end of the Little Ice Age to the 21st century. **Investigaciones Geográficas**, n. 103, e60153, 2020.
- PLÁCIDO, J.; CAPAREDA, S. Ligninolytic enzymes: a biotechnological alternative for bioethanol production. **Bioresources and Bioprocessing**, v.2, n.23, pp.1-12, 2015.
- RAO, R. G.; REVICHANDRAN, A.; KANDALAM, G.; KUMAR S.; A.; SWARAJ, S.; SRIDHAR, M. Screening of wild basidiomycetes and evaluation of the biodegradation potential of dyes and lignin by manganese peroxidases. **Bioresources**, v. 14. n. 3, pp. 6558-6576, 2019.
- ROBINSON, C. H. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. **New Phytologist**, v.151, pp.341-353, 2001.
- ROSA, L. H.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O.; VAN DJICK, P.; DESIDERI, A. Fungi in Antarctica: diversity, ecology, effects of climate change, and bioprospection for bioactive compounds. In: ROSA, L. H. **Fungi of Antarctica: diversity, Ecology and Biotechnological Applications**. Suíça: Springer, pp.1-17, 2019.

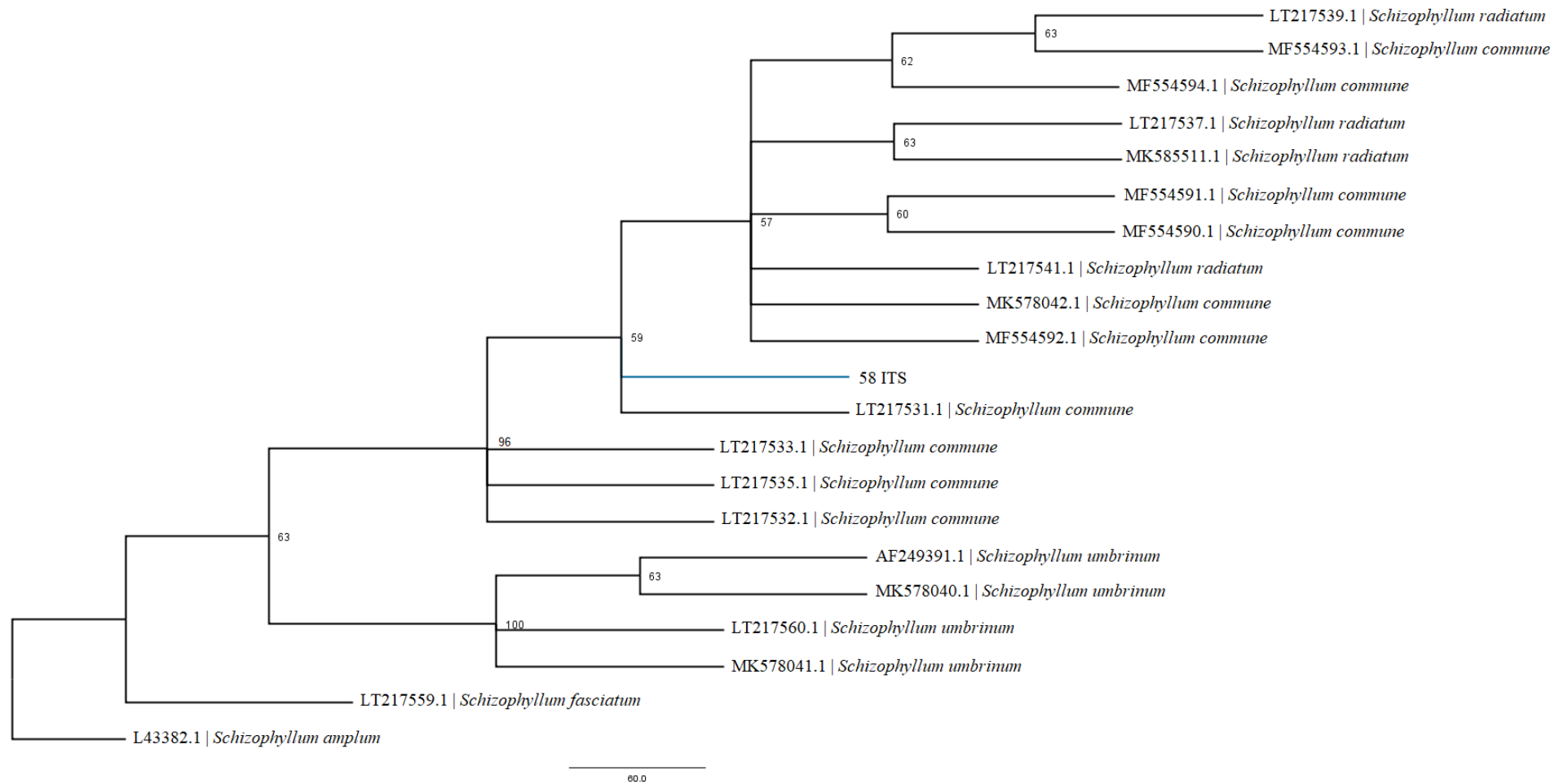
- RUISE, S.; ZUCCONI, L.; Evolution and adaptation of fungi at boundaries of life. **Advances in Space Research**, v.40, n.11, pp.1657-1664, 2007.
- SAHA, S.; SENGUPTA, J.; BANERJEE, D.; KHETAN, A.; MANDAL, S. M. *Schizophyllum commune*: a new organism in eye infection. **Mycopathologia**, v. 175, pp.357-360, 2013.
- SAMSAMI, S.; MOHAMADIZANIANI, M.; SARRAFZADEH, M. H.; RENE, E. R; FIROOZBAHR, M. Recent advances in the treatment of dye-containing wastewater from textile industries: overview and perspectives. **Process Safety and Environment**, v.143, pp. 138-163, 2020.
- SANTOS, J. A.; MEYER, E.; SETTE, L. D. Fungal community in Antarctic soil along the retreating Collins Glacier (Fildes Peninsula, King George Island). **Microorganisms**, v.8, n.8, 1145, 2020.
- SAWOSZCZUK, T.; SYGUŁA-CHOLEWIŃSKA, J.; HOYO-MELÉNDEZ, J. M. Optimization of headspace solid phase microextraction for the analysis of microbial volatile organic compounds emitted by fungi: application to historical objects. **Journal of Chromatography A**. v.1409, pp.30-45, 2015.
- SELVAKUMAR, S.; SANKAR, S. Assessment of biological decolorization and degradation of industrial effluents by *Aspergillus niger*, *Agrocybe cylindracea* and *Pleurotus florida*. **International Journal of Advanced Scientific Research & Development**, v.3, n.2, pp.100-108, 2016.
- SHABAN, M.; ABUKHADRA, M. R.; IBRAHIM, S. S.; SHAHIEN, M. G. Photocatalytic degradation and photo-Fenton oxidation of Congo red dye pollutants in water using natural chromite – response surface optimization. **Applied Water Science**, v.7, pp. 4743-4756, 2017.
- SHANMUGAM, B. K.; EASWARAN, S. N.; LAKRA, R.; DEEPA, P. R.; MAHADEVAN, S. Metabolic pathway and role of individual species in the bacterial consortium for biodegradation of azo dye: a biocalorimetric investigation. **Chemosphere**, v. 188, pp.81-89, 2017.
- SHAO, T. River in China turns red. CNN, China, 16 de dezembro de 2011. Disponível em: <<https://edition.cnn.com/2011/12/16/world/asia/china-river-of-red/index.html>>
- SHARMA, K.; HARSH, N. S. K.; VARSHNEY, V. K. Degradation of crude oil components and polycyclic aromatic compounds in a bioaugmentation study using *Schizophyllum commune*. **Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences**, v.21, n.4, pp.991-996, 2019.
- SIQUEIRA, J. P. Z.; SUTTON, D.; GENÉ, J.; GARCÍA, D.; GUEVARA-SUAREZ, M.; DECOCK, C.; WIEDERHOLD, N.; GUARRO, J. *Schizophyllum radiatum*, na emerging fungus from human respiratory tract. **Journal of Clinical Microbiology**, v.54, n.10, pp.2491-2497, 2016.
- SIMÕES, C. L.; ROSA, K. K.; CZAPELA, F. F.; VIEIRA, R.; SIMÕES, J. C. Collins glacier retreat process and regional climatic variations, King George Island, Antarctica. **Geographical Review**, v.105, n. 4, pp. 462-471, 2015.
- SINGH, L.; SINGH, V. P. Textile dyes degradation: a microbial approach for biodegradation of pollutants. In: SINGH, S. N. **Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Wastewaters**. Suíça: Springer, pp.187-204, 2015.
- SINGH, A.; PAL, D. B.; MOHAMMAD, A.; ALHAZMI, A.; HAQUE, S.; YOON, T.; SRIVASTAVA, N; GUPTA, V. K. Biological remediation Technologies for dyes and heavy metals in wastewater treatment: new insight. **Bioresource Technology**, v. 343, 126154, 2022.

- SINHA, A.; OSBORNE, W. J. Biodegradation of reactive green dye (RGD) by indigenous fungal strain VITAF-1. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 114, pp. 176-183, 2016.
- SIVASAKTHIVEL, T; REDDY, K. K. S. K. Ozone layer depletion and its effects: a review, **International Journal of Environmental Science and Development**, v. 2, n.1, pp. 30-37, 2011.
- SOLANO, A. M. S.; GARCIA-SEGURA, S.; MARTÍNEZ-HUITLE, C. A.; BRILLAS, E. Degradation of acidic aqueous solutions of the diazo dye Congo Red by photo-assisted electrochemical processes based on Fenton's reaction chemistry. **Applied Catalysis B: Environmental**, v.168-169, pp. 559-571, 2015.
- STEENSMA, D. P. "Congo" red: out of Africa?. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v.125, pp.250-252, 2001.
- SWOFFORD, D.L. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods), Version 4. Sinauer, Sunderland, MA. 2003
- TAHIR, U.; YASMIN, A. Decolorization and discovery of metabolic pathway for the degradation of Mordant Black 11 dye by *Klebsiella* sp. MB398. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.52, pp. 761-771, 2021.
- TANG, W.; JIA, R.; ZHANG, D. Decolorization and degradation of synthetic dyes by *Schizophyllum* sp. F17 in a novel system. **Desalination**, v.265, pp.22-27, 2011.
- TAVARES, M. F.; AVELINO, K. V.; ARAÚJO, N. L.; MARIM, R. A.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; VALLE, J. S. Decolorization of azo and anthraquinone dyes by crude laccase produced by *Lentinus crinitus* in solid state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.51, n.1, pp. 99-106, 2019.
- TIAN, Y.; GHOBAD-NEJHAD, M.; HE, S. H.; DAI Y. C. Three new species of *Aleurodiscus* s.l. (Russulales, Basidiomycota) from southern China. **MycoKeys**, v.37, pp.93-107, 2018.
- TOLEDO, C. V.; BARROETAVEÑA, C.; FERNANDES, A.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Chemical and antioxidante properties of wild edible mushrooms from native *Nothofagus* spp. forest, Argentina. **Molecules**, v.11, 1201, 2016.
- TOVAR-HERRERA, O. E.; MARTHA-PAZ, A. M.; PÉREZ-LLANO, Y.; ARANDA, E.; TACORONTE-MORALES, J. E.; PEDROSO-CABRERA, M. T.; ARÉVALO-NIÑO, K.; FOLCH-MALLOL, J. L.; BATISTA-GARCÍA, R. A. *Schizophyllum commune*: na unexploited source for lignocellulose degrading enzymes. **MicrobiologyOpen**, 7e637, 2018.
- TURNER, J.; BINDSCHADLER, R.; CONVEY, P.; PRISCO, G.; FAHRBACH, E.; GUTT, J.; HODGSON, D.; MAYEWSKI, P.; SUMMERHAYES, C. Antarctic climate change and the environment. **Scientific Committee on Antarctic Research**, v.1, pp.1-26, 2009.
- VACA, I.; CHÁVEZ, R. Bioactive compounds produced by Antarctic filamentous fungi. In: ROSA, L. H. **Fungi of Antarctica: diversity, Ecology and Biotechnological Applications**. Suíça: Springer, pp.265-283, 2019.
- VENTURA-CAMARGO, B. C.; MARIN-MORALES, M. A. Azo dyes: characterization and toxicity – a review. **Textiles and Light Industrial Science and Technology**, v.2, n2, pp.85-103, 2013
- VIEIRA, G. A. L.; MAGRINI, M. J.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; RODRIGUES, M. V.N.; SETTE, L. D. Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by marine-derived

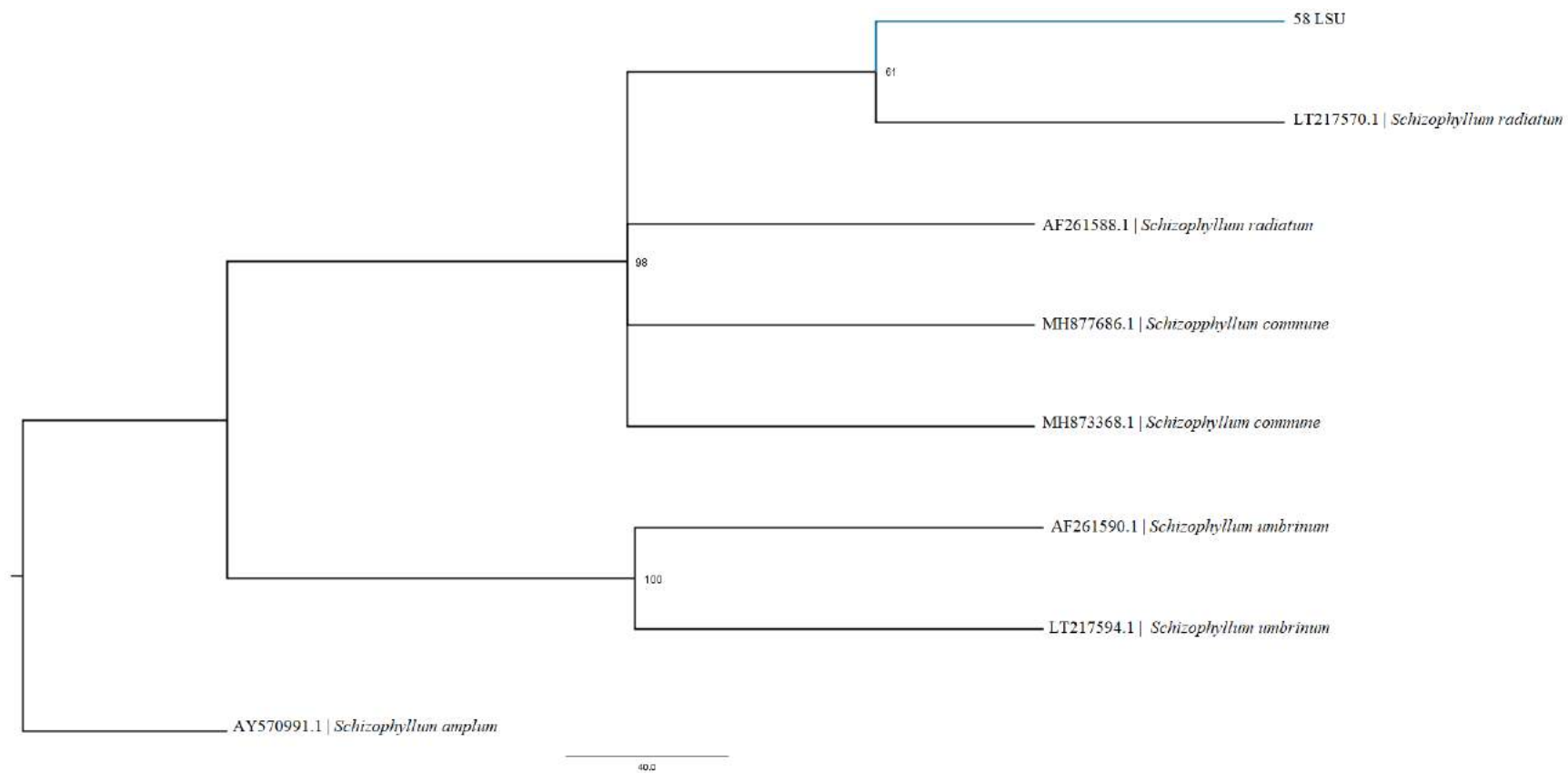
- basidiomycetes: optimization of the degradation process. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, pp. 749-756, 2018.
- EL-RAHIM, W. M. A.; MOAWAD, H.; AZEIZ, A. Z. A.; SADOWSKY, M. J. Biodegradation of azo dyes by bacterial of fungal consortium and identification of the biodegradation products. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v.47, pp.269-276, 2021.
- WANG, X., SUN, C.; GAO, S.; WANG, L. SHUOKUI, H. Validation of germination rate and root elongation as indicator to assess phytotoxicity with *Cucumis sativus*. **Chemosphere**, n. 44, p. 1711-1721, 2001.
- WANG, N.; CHU, Y.; WU, F.; ZHAO, Z.; XU, X. Decolorization and degradation of Congo red by newly isolated white rot fungus, *Ceriporia lacerata*, from decayed mulberry branches. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 117, pp. 236-244, 2017.
- WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M. H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.267, n.33, pp.23688-23695, 1992.
- WEIJERS, C. A. G. M.; BONT, J. A. M. Epoxide hydrolases from yeasts and other sources: versatile tools in biocatalysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.6, pp.199-214, 1999.
- WEN, J.; GAO, D.; ZHANG, B.; LIANG, H. Co-metabolic degradation of pyrene by indigenous white-rot fungus *Pseudotrametes gibbose* from the northeast China. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.65, n.4, pp.600-604, 2011.
- WORLD TRADE ORGANIZATION. World Trade Statistical Review 2021. 210p. 2021.
- XIAOBIN, C.; RONG, J.; PINGSHENG, L.; SHIQIAN, T.; QIN, Z.; WENZHONG, T.; XUDONG, L. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Schizophyllum* sp. F17, and decolorization of azo dyes by the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v.41, pp.258-264, 2007.
- XU, M.; YU, L.; LAING, K.; VIHMA, T.; BOZKURT, D.; HU, X.; YANG, Q. Dominant role of vertical air flows in the unprecedented warming on the Antarctic Peninsula in February 2020, **Communications Earth & Environment**, v.2, n.133, 2021.
- YANEVA, Z. L.; GEORGIEVA, N. V. Insights into Congo Red adsorption on agro-industrial materials – spectral, equilibrium, kinetic, thermodynamic, dynamic and desorption studies: a review. **International Review of Chemical Engineering**, v.4, n.2, pp.127-146, 2012.
- ZAKARIA, N. N.; CONVEY, P.; GOMEZ-FUENTES, C.; ZULKHARNAIN, A.; SABRI, S.; SHAHARUDDIN, N. A.; AHMAD, S. A. Oil bioremediation in the marine environment of Antarctica: a review and bibliometric keyword cluster analysis. **Microorganisms**, v.9, 419, 2021a.
- ZAKARIA, N. N.; GOMEZ-FUENTES, C.; KHALIL, K. A.; CONVEY, P.; ROSLEE, A. F. A.; ZULKHARNAIN, A.; SABRI, S.; SHAHARUDDIN, N. A.; CÁRDENAS, L.; AHMAD, S. A. Statistical optimization of diesel biodegradation at low temperatures by an Antarctic marine bacterial consortium isolated from non-contaminated seawater. **Microorganisms**, v.9, 1213, 2021b.
- ZHANG, Y.; LIU, Z.; NG, T. B.; CHEN, Z.; QIAO, W.; LIU, F. Purification and characterization of a novel antitumor protein with antioxidant and deoxyribonuclease activity from edible mushroom *Pholiota nameko*. **Biochimie**, v. 99, pp.28-37, 2014.

- ZHENG, Y.; CHENG, B.; FAN, J.; YU, J.; HO, W. Review on nickel-based adsorption materials for Congo red. **Journal of Hazardous Materials**, v.403, 123559, 2021.
- ZHU, N.; GU, L.; YUAN, H.; LOU, Z.; WANG, L.; ZHANG, X. Degradation pathway of the naphthalene azo dyes intermediate 1-diazo-2-naphthol-4-sulfonic acid using Fenton's reagent. **Water Research**, v.46, pp.3859-3867, 2012.

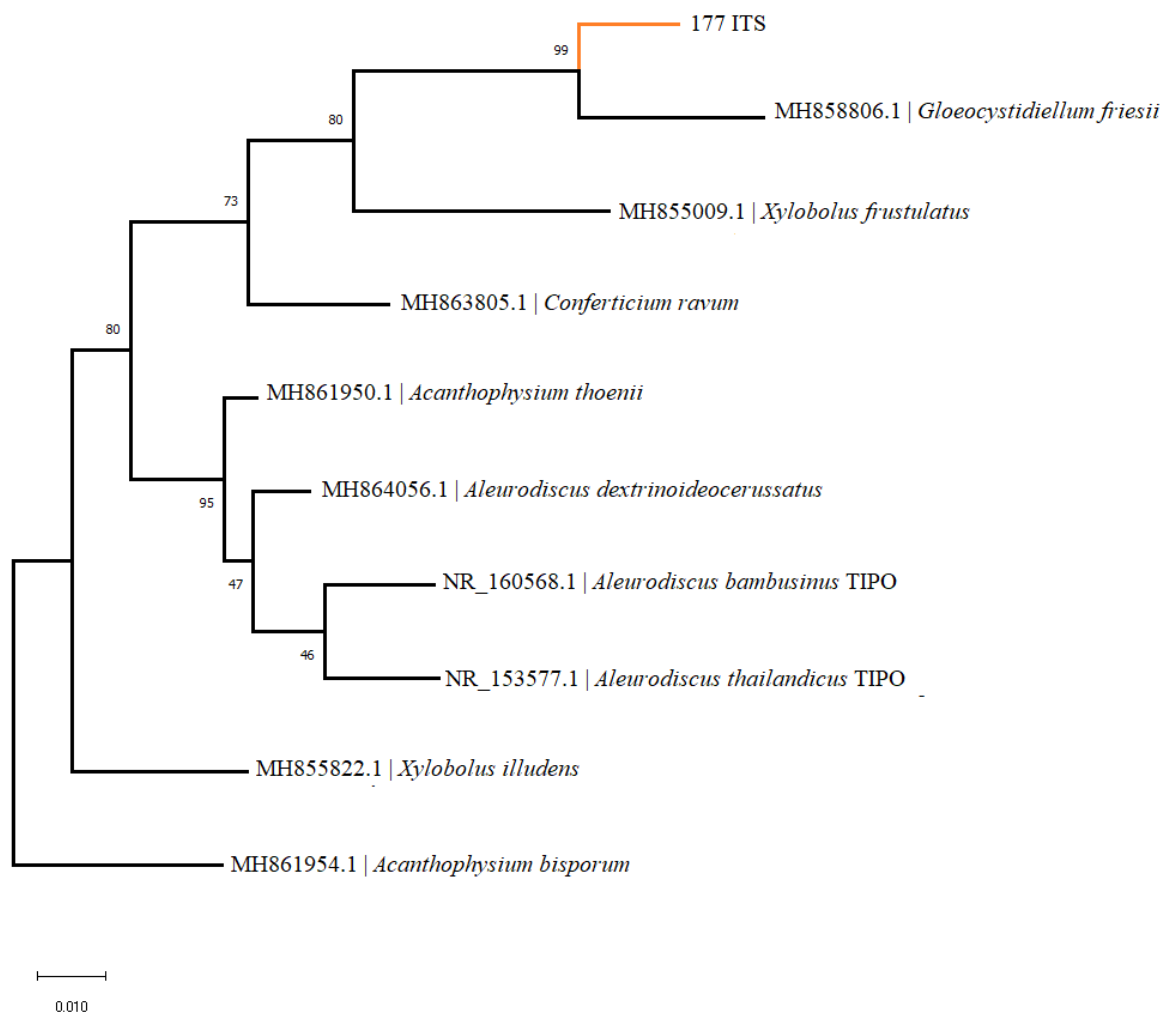
ANEXO A – Árvore filogenética para o isolado 58 com a região ITS.



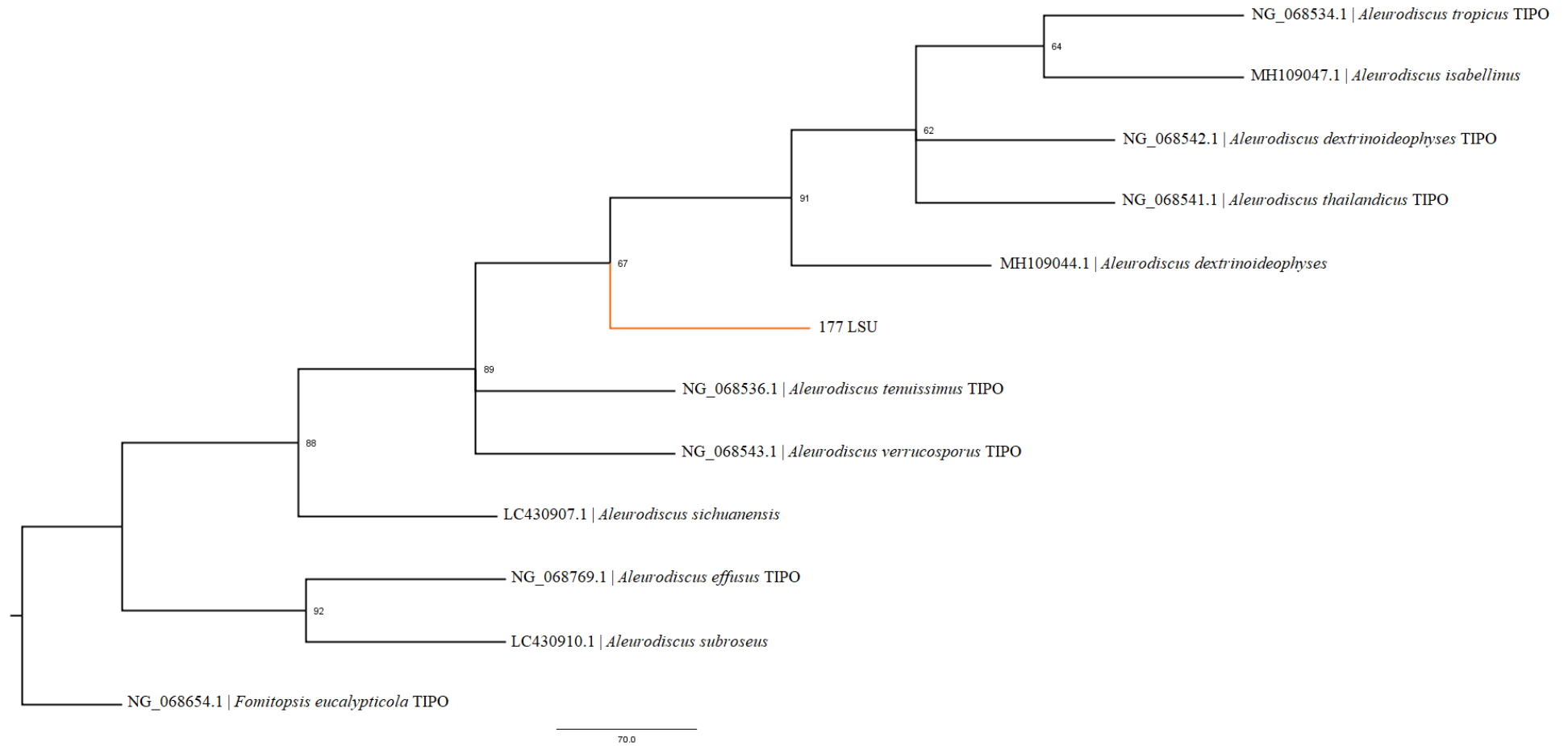
ANEXO B - Árvore filogenética para o isolado 58 com a região LSU.



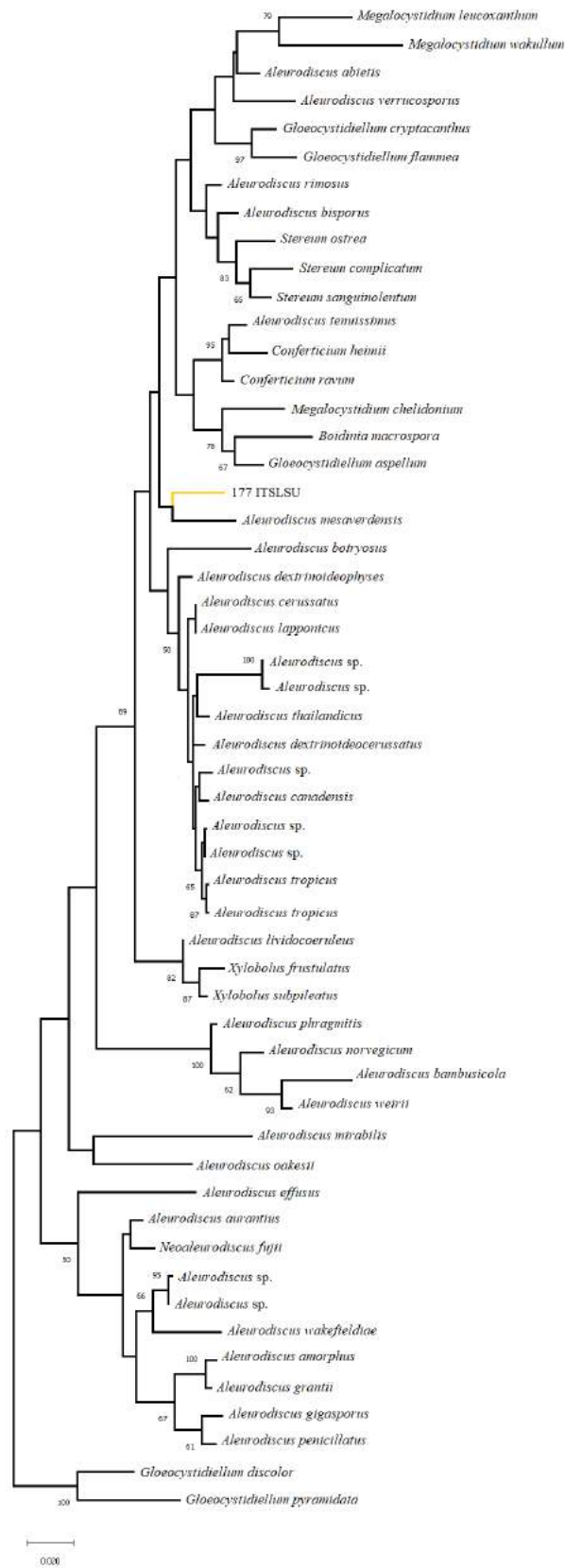
ANEXO C - Árvore filogenética para o isolado 177 com a região ITS.



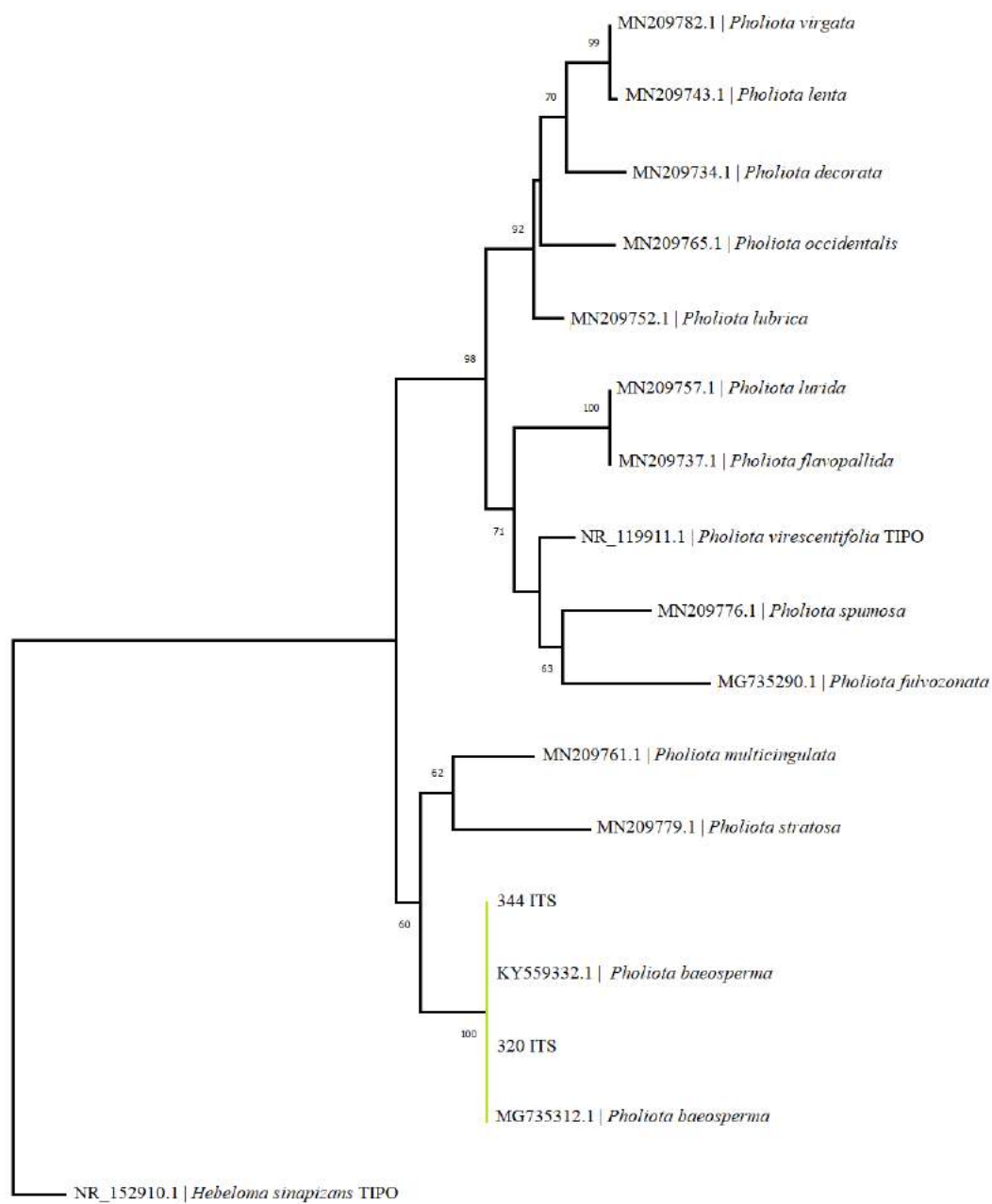
ANEXO D - Árvore filogenética para o isolado 177 com a região LSU.



ANEXO E - Árvore filogenética para o isolado 177 com a *supermatrix* de ITS e LSU.



ANEXO F - Árvore filogenética para os isolados 320 e 344 com a região ITS.



ANEXO G - Árvore filogenética para os isolados 320 e 344 com o gene *RPB2*.

