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

**DESTOXIFICAÇÃO E DESCOLORAÇÃO DE CORANTE TÊXTIL ÍNDIGO
CARMINE USANDO CONSÓRCIOS DE MICRO-ORGANISMOS DE ORIGEM
ANTÁRTICA**

THAÍS TIEMI YOSHINAGA

**Rio Claro, SP
2021**



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



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

**DESTOXIFICAÇÃO E DESCOLORAÇÃO DE CORANTE TÊXTIL ÍNDIGO
CARMINE USANDO CONSÓRCIOS DE MICRO-ORGANISMOS DE ORIGEM
ANTÁRTICA**

Thaís Tiemi Yoshinaga

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

Orientadora: Dra. Lara Durães Sette
Co-orientadora: Patricia Giovanella

**Rio Claro, SP
2021**

Y65d

Yoshinaga, Thaís Tiemi

Destoxificação e descoloração de corante têxtil índigo carmine usando consórcios de micro-organismos de origem Antártica / Thaís Tiemi

Yoshinaga. -- Rio Claro, 2021

86 f. : il., tabs., fotos

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

Orientadora: Lara Durães Sette

Coorientadora: Patricia Giovanella

1. Micologia Antártica. 2. Micro-organismos extremófilos. 3. Biotecnologia ambiental. 4. Biorremediação. 5. Corantes têxteis. I. Título.

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

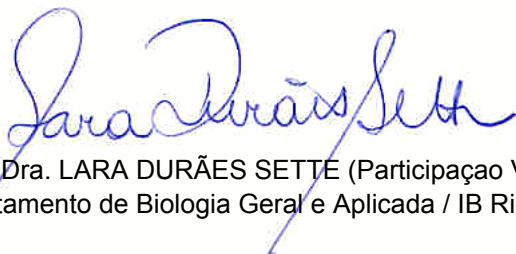
Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

DESTOXIFICAÇÃO E DESCOLORAÇÃO DE
CORANTE TÊXTIL ÍNDIGO CARMINE USANDO
CONSÓRCIOS DE MICRO-ORGANISMOS DE
ORIGEM ANTÁRTICA**AUTORA: THAÍS TIEMI YOSHINAGA****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. NORMA BUARQUE DE GUSMÃO (Participação Virtual)
Departamento de Antibióticos / Universidade Federal de Pernambuco



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, 14 de dezembro de 2021

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antônio e Valéria e meus irmãos Thomás, Túlio e Tássio, que me inspiram a fazer meu melhor todos os dias. Estes que não tem opção senão tolerar minha chatice sistemática.

Aos que me iniciaram nessa jornada da pesquisa, Elizabeth Hachiya, Ronize Faria e Sergio Nobre, o que me ensinaram durante a graduação, foi fundamental para a minha experiência na pós-graduação.

Kamylla Santos pelas sábias palavras de quem já passou pelo mestrado, e principalmente pela amizade que perpetuou e prosperou mesmo depois da graduação.

As pessoas que encontrei ao ir para Rio Claro: Gabi Farias, por toda ajuda no laboratório, por me impedir mais de uma vez de entrar em pânico e o mais importante, pelas nossas reuniões com sushis, hamburgueres e brownies para falar de jogos, livros e filmes. Giovanna Gennari e Pedro Hippólito, por tornar minha existência mais leve e alegre, especialmente durante a pandemia, onde só via vocês dois, pelas nossas incontáveis horas conversas e risadas. Carol Jonas, Charles Freire e Morgana Turunday, por todo o suporte incondicional desde o dia um do mestrado, especialmente durante os tempos difíceis e como vibramos juntos com cada etapa concluída.

A Lara Sette, por me orientar, por ter me aceitado no LAMAI, por permitir que minha experiência no mestrado tenha sido o desafio que eu precisava. Aos colegas do LAMAI, especialmente a Patrícia que me coorientou e Elisa, que me ajudou bastante quando estava iniciando no laboratório.

As demais pessoas que contribuíram com o desenvolvimento do trabalho, aos colegas do LESF e do LaQBiM, aos servidores do antigo Departamento de Bioquímica e Microbiologia e Unesp – Rio Claro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do projeto, Processo 2018/12098-9.

RESUMO

O ambiente marinho antártico é conhecido por suas condições extremas, sendo a permanência e adaptação de micro-organismos a esse nicho ecológico um processo que resulta em metabolismos diferenciados. Estes, envolvem a produção de enzimas adaptadas a condições salinas e com atividades em temperaturas baixas, as quais podem ser aplicadas em processos ambientais e industriais. A biorremediação é uma destas áreas, sendo os micro-organismos e suas enzimas utilizadas para a degradação de poluentes ambientais como corantes têxteis, petróleo e derivados, entre outros. Nesse contexto, os objetivos deste trabalho foram caracterizar e avaliar fungos filamentosos (n = 20) isolados de sedimentos marinhos antárticos (coletados durante a OPERANTAR XXXVII) quanto a habilidade de destoxificar e descolorir o corante têxtil índigo carmine. Os 20 fungos foram taxonomicamente identificados por meio de análises morfológicas e moleculares e tiveram as temperaturas ótimas de crescimento avaliadas. Foram realizados ensaios individuais para descoloração e destoxificação do índigo carmine. Em adição, os fungos foram cultivados em consórcios e avaliados quanto a descoloração, fitotoxicidade e produção de enzimas ligninolíticas. Um dos consórcios foi selecionado e fungos basidiomicetos de origem marinha da costa brasileira (*Peniophora* sp. CBMAI 1063) e de origem terrestre da Antártica (*Pholiota* sp. CRM 2306) foram adicionados ao mesmo visando avaliação da descoloração, fitotoxicidade, biomassa e de metabólitos do processo degradativo. Doze isolados foram identificados no nível de gênero, para oito isolados não foi possível definir gênero, sendo inferidos dois possíveis gêneros. Dois fungos (J2B e J2C) apresentaram temperatura ótima a 15 °C, oito (J2F, D2B, D8A, D8B, J2D, J8A, D2A e D2D) a 20 °C, quatro (J2E1, J2E2, J8B1 e J8B2) a 25 °C e cinco (D2C, D2P, D8C1, D8C2 e J2A) a 30 °C. Para o isolado J2D não foi possível definir a temperatura ótima de crescimento, visto que houve crescimento em toda a área disponível em todas as temperaturas avaliadas. Os melhores resultados de descoloração foram obtidos com os isolados J2A (82%), D2C (76%), D2P (60%) e J2C (37%). Os melhores resultados de destoxificação foram obtidos com os isolados J2F (74%), J8A (49%) e D8C2 (33%). Esses fungos foram identificados como *Penicillium* cf. *oxalicum* (J2A, D2C e D2P), *Leuconeurospora* sp. (J2C), *Geomyces/Pseudogymnoascus* sp. (J2F e J8A), *Aspergillus* cf. *sydowii* (D8C2). Os isolados J2C, J2F e D8C2 foram utilizados como base para compor os consórcios, que foram diferenciados pelo *Penicillium* cf. *oxalicum* de cada consórcio J2A (consórcio 1 – C1), D2C (consórcio 2 – C2) e D2P (consórcio 3 – C3). Os consórcios C1, C2 e C3 apresentaram 48%, 63% e 57% de descoloração, respectivamente e exibiram 100% de toxicidade, não havendo detecção das enzimas ligninolíticas avaliadas. O C2 foi selecionado para estudos com os basidiomicetos, o C2 + *Peniophora* sp. (C2 PEN) apresentou descoloração de 40%, enquanto para o C2 + *Pholiota* sp. (C2 PHO) a descoloração foi de 50%. A fitotoxicidade do bioensaio conduzido com o C2 PEN foi mais baixa do que a do controle, indicando potencial de destoxificação. Uma maior biomassa fúngica foi produzida na presença do corante em comparação ao experimento controle (sem adição de corante) para todos os tratamentos. Os metabólitos de degradação observados em todos os tratamentos foram identificados como hidrocarbonetos, ácidos graxos simples e compostos nitrogenados pertencentes ao grupo de aminas graxas, os quais não estão relacionados diretamente com a degradação do corante índigo carmine. O presente trabalho evidencia a diversidade de fungos marinhos antárticos, bem como o potencial destes micro-organismos extremófilos, seja de forma individual ou em consórcio, para degradar e adsorver o corante índigo carmine. Os resultados estimulam a condução de novos estudos para elucidação dos mecanismos de degradação do corante têxtil por estes isolados.

Palavras-chave: Micologia Antártica, Micro-organismos extremófilos; Biotecnologia ambiental, Biorremediação; Corantes têxteis.

ABSTRACT

The Antarctic environment is known for its extreme conditions, and the adaptation of microorganisms to this ecological niche is a process that requires enzymatic mechanisms and diversified strategies. These strategies include production of enzymes adapted to saline conditions and with activities at low temperatures, which can be applied in environmental and industrial processes. Bioremediation is one of these areas, which microorganisms and their enzymes are being used for the degradation of environmental pollutants such as textile dyes, petroleum, and derivatives, among others. In this context, the objectives of this study were to characterize and evaluate filamentous fungi ($n = 20$) isolated from Antarctic marine sediments (collected during OPERANTAR XXXVII) for their ability to detoxify and decolorize the indigo carmine textile dye. The 20 fungi were taxonomically identified through morphological and molecular analyses and had their optimal growth temperatures evaluated. Individual screenings were made with all fungi to assess decolorization and detoxification of indigo carmine dye. In addition, the fungi were cultured in consortia and evaluated for decolorization, phytotoxicity and production of ligninolytic enzymes. One of the consortia was selected and evaluated with the addition of a marine (*Peniophora* sp. CBMAI 1063) or an antarctic (*Pholiota* sp. CRM 2306) basidiomycete fungi for decolorization, phytotoxicity, dry biomass and metabolites from degradative process. Twelve isolates were identified at genus level, for eight isolates were not possible to define genus, being inferred two possible genera. Two fungi (J2B and J2C) showed optimal temperature at 15 °C, eight (J2F, D2B, D8A, D8B, J2D, J8A, D2A, and D2D) at 20 °C, four (J2E1, J2E2, J8B1, and J8B2) at 25 °C and five (D2C, D2P, D8C1, D8C2, and J2A) at 30 °C. For one isolate (J2D) it was not possible to define the optimal growth temperature since there was growth in all disponible area at all temperatures. The best results of decolorization were obtained with the isolates J2A (82%), D2C (76%), D2P (60%), and J2C (37%). The best detoxification results were obtained with the isolates J2F (74%), J8A (49%), and D8C2 (33%). These fungi were identified as *Penicillium* cf. *oxalicum* (J2A, D2C, and D2P), *Leuconeurospora* sp. (J2C), *Geomyces/Pseudogymnoascus* sp. (J2F and J8A), *Aspergillus* cf. *sydowii* (D8C2). The isolates J2C, J2F and D8C2 were used as base for the tree consortia, which were differentiated by the *Penicillium* cf. *oxalicum* in each consortium J2A (consortium 1 – C1), D2C (consortium 2 – C2) and D2P (consortium 3 – C3). Consortia C1, C2 and C3 showed 48%, 63%, and 57% of decolorization, respectively, and exhibited 100% of toxicity, with no detection of ligninolytic enzymes. The C2 consortium was selected and submitted to experiments with the addition of basidiomycete fungi, the C2 + *Peniophora* sp. (C2 PEN) showed 40% of decolorization, while for C2 + *Pholiota* sp. (C2 PHO) the decolorization was 50%. The phytotoxicity of the bioassay conducted with C2 PEN was lower than that found in the control, indicating the potential for detoxification. Greater fungal biomass was produced in the presence of dye compared to the control experiment (without the addition of dye) for all treatments. The metabolites detected were identified as hydrocarbons, fatty acids, and nitrogen compounds belonging to the group of fatty amines, which are not directly related to the degradation of the indigo carmine. The present study highlights the diversity of Antarctic marine fungi, as well as the potential of these extremophile microorganisms, either individually or in a consortium, to degrade and absorb the indigo carmine dye. The results encourage further studies to elucidate the degradation mechanisms of the textile dye by these isolates.

Keywords: Antarctic mycology, Extremophile microorganisms, Environmental biotechnology, Bioremediation, Textile dye.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	7
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1.	Fungos antárticos	9
2.2.	Contaminação ambiental pela indústria têxtil	11
2.3.	Corantes tipo índigo	12
2.4.	Tratamento de efluentes têxteis	13
2.5.	Biorremediação de corantes e efluentes têxteis por fungos	15
2.5.1.	<i>Adsorção de corantes têxteis por fungos.....</i>	<i>16</i>
2.5.2.	<i>Degradação enzimática de corantes têxteis por fungos.....</i>	<i>16</i>
2.6.	Biodegradação de índigo carmine	18
2.6.1.	<i>Metabólitos de degradação do índigo carmine.....</i>	<i>19</i>
3.	OBJETIVOS	21
3.1.	Objetivos Específicos	21
4.	MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1.	Corante têxtil índigo carmine	22
4.2.	Fungos marinhos antárticos.....	22
4.3.	Caracterização taxonômica.....	23
4.3.1.	<i>Caracterização morfológica.....</i>	<i>23</i>
4.3.2.	<i>Caracterização molecular</i>	<i>24</i>
4.4.	Temperatura ótima de crescimento	24
4.5.	Antagonismo entre os isolados.....	25
4.6.	Descoloração e destoxificação do corante têxtil índigo carmine pelos fungos marinhos.....	25
4.6.1.	<i>Descoloração.....</i>	<i>26</i>
4.6.2.	<i>Fitotoxicidade.....</i>	<i>26</i>
4.7.	Estruturação dos consórcios fúngicos	26
4.8.	Ensaio de degradação do índigo carmine pelos consórcios	27
4.8.1.	<i>Avaliação da presença de enzimas.....</i>	<i>27</i>
4.8.1.1.	<i>Lacase.....</i>	<i>28</i>
4.8.1.2.	<i>Lignina Peroxidase.....</i>	<i>28</i>
4.8.1.3.	<i>Manganês Peroxidase</i>	<i>28</i>
4.8.2.	<i>Adsorção do corante pelo micélio inativado.....</i>	<i>29</i>
4.8.2.1.	<i>Preparo da biomassa.....</i>	<i>29</i>
4.8.2.2.	<i>Ensaio de adsorção</i>	<i>29</i>
4.9.	Descoloração e destoxificação do índigo carmine pelos consórcios fúngicos associados a basidiomicetos antártico e marinho da costa brasileira	29

4.9.1.	<i>Descoloração do corante índigo carmine pelos consórcios fúngicos.....</i>	30
4.9.2.	<i>Fitotoxicidade do corante índigo carmine após tratamento com os consórcios fúngicos</i>	30
4.9.3.	<i>Análise de biomassa dos consórcios com adição dos basidiomicetos <i>Pholiota sp.</i> e <i>Peniophora sp.</i>.....</i>	31
4.9.4.	<i>Análise de metabólitos de degradação por GC-MS.....</i>	31
4.9.4.1.	<i>Extração e preparo das amostras</i>	31
4.9.4.2.	<i>Análise de GC-MS.....</i>	32
4.10.	Análises estatísticas.....	32
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1.	Caracterização taxonômica.....	33
5.2.	Temperatura ótima de crescimento	37
5.3.	Antagonismo entre os isolados.....	42
5.4.	Descoloração e destoxificação do corante têxtil índigo carmine pelos fungos marinhos.....	44
5.5.	Ensaio de degradação do corante têxtil índigo carmine pelos consórcios fúngicos	47
5.5.1.	<i>Descoloração do corante índigo carmine pelos consórcios fúngicos.....</i>	48
5.5.2.	<i>Fitotoxicidade do corante índigo carmine após tratamento com os consórcios fúngicos</i>	50
5.5.3.	<i>Avaliação da presença de enzimas ligninolíticas.....</i>	51
5.5.4.	<i>Adsorção do corante índigo carmine pelos micélios inativados.....</i>	52
5.6.	Ensaio dos consórcios acrescidos dos basidiomicetos <i>Peniophora sp.</i> CBMAI 1063 e <i>Pholiota sp.</i> CRM 2306.....	54
5.6.1.	<i>Descoloração do corante índigo carmine pelos consórcios com inclusão dos basidiomicetos</i>	54
5.6.2.	<i>Toxicidade do corante índigo carmine após tratamento com os consórcios acrescidos dos basidiomicetos.....</i>	56
5.6.3.	<i>Biomassa seca dos consórcios</i>	57
5.6.4.	<i>Metabólitos de degradação GC-MS.....</i>	59
6.	CONCLUSÕES.....	63
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
	APÊNDICES	74

1. INTRODUÇÃO

Organismos extremófilos têm essa classificação devido a habilidade de adaptação, sobrevivência e reprodução em ambientes extremos como os da Antártica. O continente antártico tem uma extensa área, compreendendo sub-regiões com diferentes características, apresentando condições como temperaturas baixas, ciclos de congelamento, bem como baixa umidade, alta incidência de UV, ventos fortes e baixa disponibilidade de nutrientes que, em combinação, são um desafio para o desenvolvimento de vida macro e microscópica (RUISI *et al.*, 2007; TSUJI, 2016). No ecossistema marinho antártico não é diferente, além das temperaturas baixas, a salinidade e pressão em diferentes níveis nos oceanos, que selecionam os organismos que ali habitam (DALMASO; FERREIRA; VERMELHO, 2015; DUARTE *et al.*, 2018a). Mesmo diante desse cenário, estudos realizados com amostras dos ecossistemas terrestres e marinhos da Antártica têm revelado uma alta riqueza e diversidade de espécies microbianas nesses ambientes (ALVES *et al.*, 2019; SANTOS; MEYER; SETTE, 2020; WENTZEL *et al.*, 2019).

Estima-se que os micro-organismos marinhos, principalmente fungos, tenham diversidade e potencial para produção de biomoléculas de interesse em diferentes setores de relevância socioeconômica, desde enzimas, como hidrolases e oxigenases, a metabólitos secundários com atividade antibiótica e antitumoral (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2015; BUGNI; IRELAND, 2004; PICARD, 2017).

Os fungos marinhos e oriundos da Antártica têm atraído atenção devido ao seu potencial biotecnológico. Suas enzimas têm aplicação em vários setores industriais, uma vez que são enzimas com atividade em condições salinas e de baixas temperaturas, além da estabilidade em condições adversas (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2010; VIEIRA *et al.*, 2021). Estas enzimas aplicadas em processos industriais podem ser uma forma de otimizar processos e gerar menos resíduos, economizando energia, recursos e tempo (ASADI; MAKHDOUMI; ASOODEH, 2020; HAMAD; SAIED, 2021).

Nos últimos anos, com a crescente discussão sobre sustentabilidade e conservação ambiental, o uso de micro-organismos e seus produtos metabólicos mostram-se como uma estratégia para a prática destes conceitos (HUY *et al.*, 2020; LOPES *et al.*, 2020; VALDEZ-VASQUES *et al.*, 2020). Uma das formas de aplicação destes micro-organismos é a biorremediação de poluentes ambientais, onde fungos e/ou suas enzimas são utilizados para a degradação e mineralização destes poluentes (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2010; GIOVANELLA *et al.*, 2020). O uso de consórcios microbianos pode proporcionar uma

diversidade metabólica que podem ser complementar, aumentando a chance de degradação e mineralização do poluente. Em certas condições, os fungos associados podem resultar em uma eficiência superior quando comparado ao desempenho de fungos isolados (MISHRA; MALIK, 2014; SHAKEEL *et al.*, 2020).

O setor têxtil é considerado um dos setores mais poluentes da indústria. O uso de água nesse setor pode chegar a 300 L por kg de tecido processado, o que consequentemente, gera uma alta produção de efluentes (ABBASI, 2017; BENTO *et al.*, 2020). Os corantes têxteis presentes nestes efluentes são uma grande preocupação, tanto pela complexidade quanto pelo potencial de dispersão. Estes compostos além de serem tóxicos podem se tornar a causa de diferentes problemas ambientais nos corpos d'água, pois mesmo em baixas concentrações podem alterar parâmetros como a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e a Demanda Química de Oxigênio (DQO), assim como interferir nos processos fotossintéticos do corpo d'água (BHATIA *et al.*, 2017).

Sabe-se que enzimas do grupo das ligninases, utilizadas pelos organismos para degradar lignina, composto presente em toda biomassa vegetal, são enzimas que podem atuar na biodegradação de corantes têxteis. Diversos trabalhos reportam a habilidade dos fungos para degradar o corante por meio de enzimas e/ou adsorver no micélio (ABBASI, 2017; HUY *et al.*, 2020; LOPES *et al.*, 2020; VIEIRA *et al.*, 2021). O complexo do citocromo P450 também foi reportado no metabolismo de poluentes ambientais (*e.g.* corantes têxteis, hidrocarbonetos aromáticos, compostos sintéticos e fármacos) em diferentes níveis tróficos. Em organismos marinhos inclusive, já foram observadas adaptações para ativação em condições de baixa temperatura, pH extremos, pressão e salinidade (SHARIFIAN *et al.*, 2020).

Neste contexto, o grupo de pesquisa liderado pela Profa. Dra. Lara Sette tem focado seus estudos no isolamento, preservação, seleção e diversidade de fungos do ambiente antártico visando obtenção de enzimas com aplicação biotecnológica na área ambiental. O presente trabalho teve como objetivos caracterizar fungos do ambiente marinho antártico e aplicar esses recursos microbianos em consórcios para a descoloração e destoxificação do corante têxtil índigo carmine.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fungos antárticos

A Antártica é o 5º maior continente do mundo, localizado mais ao sul do planeta e com área de 14 milhões de km². É também chamado de continente dos extremos, uma vez que as características climáticas compreendem temperaturas baixas, ventos fortes, ciclos de congelamento, baixa umidade e alta incidência de raios UV (RUISE *et al.*, 2007; TSUJI, 2016).

Sobreviver em tal ambiente requer adaptações morfológicas e fisiológicas, considerando que as características locais restringem a quantidade de nichos disponíveis para desenvolvimento de organismos vivos. Nesse contexto, os fungos são um ótimo objeto de estudo, pois podem ocupar diferentes nichos (saprófitos, simbiontes ou parasitas), utilizar diferentes formas de substratos, com importante destaque na ciclagem de carbono nestes ambientes (GONÇALVES *et al.*, 2017; TSUJI, 2016).

As adaptações às temperaturas baixas envolvem a alteração da composição da membrana, sendo que a proporção de ácidos graxos insaturados ajuda a manter o meio celular em condições ótimas de funcionamento nestas temperaturas (RUISE *et al.*, 2007). O acúmulo de polissacarídeos, como glicerol, trealose e manitol, e aminoácidos aromáticos são uma resposta a condição de temperatura sub-zero, agindo como crioprotetores (TSUJI, 2016). Estes compostos intracelulares podem auxiliar a estabilizar a membrana e favorecer a atividade metabólica (RUISE *et al.*, 2007).

Os fungos são frequentemente recuperados de amostras marinhas e terrestres da Antártica. Fungos cosmopolitas psicrotolerantes, isto é, fungos com habilidade de tolerar baixas temperaturas são comumente encontrados na Antártica, incluindo representantes dos gêneros *Pseudogymnoascus*, *Pseudoderotium*, *Mortierella*, *Cadophora*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Cosmospora*, *Aspergillus*, entre outros (ALVES *et al.*, 2019; GONÇALVES *et al.*, 2017; SANTOS; MEYER; SETTE, 2020; WENTZEL *et al.*, 2019). Os fungos psicrófilos são aqueles com crescimento ótimo abaixo de 15 °C, sendo a temperatura mínima e máxima de crescimento entre a 0°C e 20 °C, seu isolamento é menos frequente, seja pelo uso de métodos inadequados ou pela competitividade de fungos psicrotolerantes (ROBINSON, 2001).

No oceano, os fungos podem ocupar diferentes níveis tróficos, são encontrados como parasitas, patógenos ou em relações mutualísticas (GLADFELTER; JAMES; AMEND 2019; GROSSART; ROJAS-JIMENEZ, 2016). Habitam colunas d'água, sedimentos, regiões abissais e organismos marinhos como esponjas do mar, crustáceos e algas. Nesses ambientes, os fungos

são os principais responsáveis pela ciclagem de nutrientes e pela cadeia de transporte de carbono no gradiente de água até o sedimento (BOVIO *et al.*, 2019; GONÇALVES *et al.*, 2017). Os primeiros registros de fungos em ambientes marinhos datam do século 19. Pode-se estimar a diversidade de fungos marinhos em mais de 10.000 espécies, o que representa apenas 1% das espécies de fungos descritas. Estudos envolvendo métodos independentes de cultivo têm indicado muitas espécies ainda não descritas (AMEND *et al.*, 2019; PICARD, 2017).

Existe um grande debate sobre a definição de fungo marinho, sendo os marinhos obrigatórios tratados como aqueles que crescem e esporulam exclusivamente em ambiente marinho e estuário e, os marinhos facultativos, aqueles capazes de habitar ambientes marinhos e terrestres (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2015; PANG *et al.*, 2016). Embora espécies facultativas se estabeleçam em ambos os ambientes, as condições presentes no ambiente marinho são suficientes para que as características metabólicas e enzimáticas sejam diferentes das linhagens terrestres (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2010). Estes fatores de seleção incluem: salinidade, alta pressão, baixa temperatura, pHs extremos e baixa disponibilidade de nutrientes (PANG *et al.*, 2016). A salinidade é um dos principais desafios para sobreviver neste ambiente, obrigando os organismos a desenvolverem modificações morfológicas e fisiológicas para tolerância osmótica. As adaptações mais comuns a esse ambiente são os diferentes lipídios componentes da membrana citoplasmática, a produção de polissacarídeos e mucilagem e a presença de bombas de solutos (GLADFELTER; JAMES; AMEND, 2019; PANG *et al.*, 2016).

Para lidar com as condições extremas do ambiente marinho antártico, os fungos desenvolveram algumas adaptações enzimáticas, que incluem: atividade na presença de solventes orgânicos, em baixas temperaturas, sob alta pressão e na presença de sais e metais (AL-TOHAMY *et al.*, 2020; GLADFELTER; JAMES; AMEND, 2019). As enzimas com baixa temperatura de ativação e com tolerância a salinidade podem ser vantajosas para processos industriais. Estas enzimas adaptadas podem ser aplicadas em condições salinas, alcalinas e ácidas, enquanto a baixa energia de ativação e estabilidade térmica podem proporcionar redução no custo energético de processos industriais ((BRUNO *et al.*, 2019; DUARTE *et al.*, 2018a).

Com o avanço tecnológico, o acesso e processamento de informação foi facilitado. O grande impulso para a exploração do ambiente marinho veio com a busca por metabólitos secundários. Nos últimos 40 anos, mais de 35 % dos novos metabólitos com potencial biotecnológico foram produzidos por fungos marinhos (BOVIO *et al.*, 2019). Os recursos genéticos antárticos têm sido explorados por suas enzimas e metabólitos secundários. Shi *et al.* (2021) estudando os metabólitos de um fungo do gênero *Pseudogymnoascus*, descobriram um novo policetídio com atividade antibacteriana contra *Xantomonas citri*, *Staphylococcus aureus*

e *Pseudomonas fulva*. Os principais produtos bioprospectados são substâncias de uso biomédico (antibióticos, antitumorais) e enzimas (hidrolases e oxidases), estas últimas por sua versatilidade possuem aplicação em vários setores industriais e no setor ambiental.

2.2. Contaminação ambiental pela indústria têxtil

O setor têxtil tem grande importância econômico-social. No ano de 2020 o lucro em escala global do setor têxtil foi de US\$ 594,61 bilhões com previsão de US\$ 654, 57 em 2021 (BUSINESS WIRE, 2021). Na economia brasileira, o faturamento foi de R\$ 185,7 bilhões em 2019, sendo o Brasil o segundo maior produtor de jeans e terceiro maior produtor de malhas no mundo. Este segmento, emprega cerca de 1,5 milhões de pessoas e movimenta outros setores em toda a cadeia produtiva (Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção - ABIT, 2021). No Brasil, os principais polos têxteis se concentram nas regiões do Vale do Itajaí – SC, no agreste pernambucano, no estado do Ceará e na região de Americana no interior de São Paulo, movimentando bilhões de reais em produção de fibras artificiais e sintéticas (FIBRATEX GROUP, 2020).

Como atividade industrial, além da emissão de gases, vapores e materiais particulados, o setor têxtil faz uso extenso de água e como consequência há uma grande produção de efluentes (ABBASI, 2017; BASTIAN, 2009). Por este motivo, a indústria têxtil é considerada uma das mais poluentes, onde estima-se que cerca de 200 L de água sejam consumidos por quilo de tecido na etapa de tingimento, e entre 40 e 65 L de efluentes gerados por quilo de tecido em outros processos (BENTO *et al.*, 2020; SAMSAMI *et al.*, 2020).

Além do volume, a composição química dos efluentes pode ser diferente para cada tipo de tecido produzido. Nos efluentes têxteis, são encontrados diferentes tipos de corantes, detergentes, compostos sulfurados, solventes, metais pesados e sais. Assim, a composição química é um fator determinante na forma e custo do processo de tratamento do efluente têxtil (ABBASI, 2017).

Dentre os compostos presentes nestes efluentes, os corantes são os que geram maior preocupação devido à complexidade e potencial de dispersão. As principais fontes de efluentes contendo corantes são a indústria têxtil e de couro (55%). Considerando que há entre 5% e 50% de perda de corante durante o processamento em tecidos, pode-se estimar que cerca de 280.000 toneladas de corantes são lançadas anualmente em cursos d'água na forma de efluente têxtil (TKACZYK; MITROWSKA; POSYNIK, 2020).

Os corantes sintéticos têm ampla utilização na indústria têxtil e possuem variações de solubilidade, propriedades físico-químicas e grupos cromóforos (BHATIA *et al.*, 2017). A molécula do corante é composta da parte cromófora, grupo que absorve a luz, e da parte auxocroma, grupos que suplementam a molécula e garantem a fixação, estabilidade e solubilidade. Os grupos cromóforos mais comuns são: nitro (-NO₂), azo (-N=N-), nitroso (-N=O-), tiocarbonil (-C=S-), carbonil (-C=O-) e alcenos (-C=C-) ou (-C=N). Já os grupos auxocromos podem ser ácidos (COOH, SO₃, OH) ou básicos (NH₂, NH₃, CO₂H,) (CHOWDHURY *et al.*, 2020; SAMSAMI *et al.*, 2020). Consequentemente, são compostos que apresentam baixa degradabilidade. Além da recalcitrância dos corantes, a presença de metais, sais e outros compostos no efluente dificultam a degradação, podendo tornar complicado o tratamento destes efluentes (CHOI *et al.*, 2021; IMRAN *et al.*, 2015; VARJANI *et al.*, 2020).

Existem aproximadamente 25 grupos de corantes, são classificados considerando sua estrutura química (azo, azidina, nitro, nitroso, indigoide, antraquinona, ftalocianina, tiazina, trifenilmetano), grupo cromóforo ou método de aplicação (ácido, básico, direto, disperso, vat, reativo, mordante). Estima-se que existam cerca de 100.000 variações de corantes sintéticos, sendo a produção anual em torno de 1.000.000 de toneladas (TKACZYK; MITROWSKA; POSYNIK, 2020). Estes compostos podem se tornar a causa de diferentes problemas ambientais. Em corpos d'água, mesmo em baixas concentrações, podem alterar parâmetros de qualidade como DBO e DQO, assim como interferir nos processos fotossintéticos dos corpos d'água.

Os corantes podem ser degradados em formas mais tóxicas, especialmente hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e aminas aromáticas, que além de tóxicos podem ser mutagênicos (ABBASI, 2017; BRÜSCHWEILER; MERLOT, 2017; ROVIRA; DOMINGO, 2019). A toxicidade varia para cada corante, sendo este fator influenciado pelo ambiente e condições em que se encontram. No ambiente aquático, podem agir de forma diferente em cada nível trófico e causar efeitos adversos mesmo em baixas concentrações. Um dos agravantes é que podem precipitar e acumular no sedimento e bioacumular em organismos vivos (TKACZYK; MITROWSKA; POSYNIK, 2020).

2.3. Corantes tipo índigo

O corante índigo pertence à classe dos corantes indigoides que são conhecidos por serem inertes e resistentes à exposição ao calor, luz e pHs extremos. Os corantes tipo índigo

são em geral insolúveis e tipo vat (precisam de um meio alcalino para adesão na fibra), sendo necessário o uso de coadjuvantes para gerar formulações com maior adesão à fibra têxtil (CHOI *et al.*, 2021).

A classe dos corantes indigoides é uma das mais antigas, com um dos registros mais antigos datando de 6.000 anos no Peru, e havendo registros tão antigos quanto no Egito e Ásia. São comumente utilizados na indústria têxtil, alimentícia e cosmética. Estima-se anualmente o consumo de 40.000 e 50.000 toneladas de índigo e derivados de índigo (BENTO *et al.*, 2020; CHOWDHURI *et al.*, 2020; MENDOZA-AVILA; CHAUHAN; VAZQUEZ-DUHALT, 2020).

Originalmente o índigo era extraído de plantas, onde as folhas eram fermentadas para liberar o indican ou insatan, que é oxidado naturalmente com o ar, resultando na dimerização da molécula que forma o índigo (MENDOZA-AVILA; CHAUHAN; VAZQUEZ-DUHALT, 2020). A síntese química do índigo teve início em 1870, a partir da insatina, e desde então outras formas derivadas foram desenvolvidas. Pode ser sintetizado a partir da oxidação do indol, outras variantes são produzidas com catalisadores inorgânicos e químicos tóxicos (FABARA; FRAAIJE, 2020).

Uma das formas sintéticas mais populares é o índigo carmine, que é sintetizado em grande escala a partir da redução do índigo com ditionato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), seguido de oxidação pelo ar. Outros derivados comuns do índigo são o vat índigo, tioíndigo e o tetracoloro índigo (**Figura 1**) (CHOWDHURY *et al.*, 2020; FABARA; FRAAIJE, 2020).

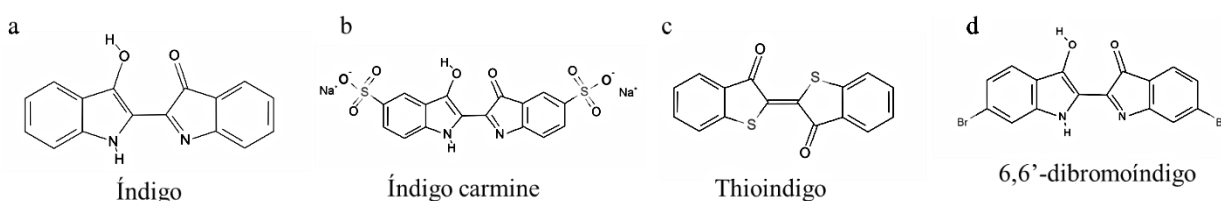


Figura 1: Formas derivadas do índigo. A – índigo; B – Índigo carmine; C - Thioindigo; D – 6,6'-dibromoíndigo. **Fonte:** a autora.

2.4. Tratamento de efluentes têxteis

Diferentes métodos de tratamento podem ser aplicados aos efluentes têxteis. Podem ter caráter físico, químico ou biológico. Em geral, são aplicados dois ou mais métodos para atender às demandas dos órgãos regulamentadores (RASHID *et al.*, 2021).

Os métodos químicos utilizam processos oxidativos como método de catálise dos grupos cromóforos. Envolvem espécies reativas do oxigênio (ozônio e peróxidos), foto eletrólise e oxidação eletroquímica. Estes métodos são eficientes na remoção da cor do efluente, entretanto, acarretam alto custo de manutenção e formam diversos subprodutos tóxicos (SAMSAMI *et al.*, 2020).

Os métodos físicos mais comuns são a filtração, adsorção, floculação e precipitação. A adsorção envolve a transferência de massa de uma fase líquida para uma superfície sólida, enquanto a floculação e precipitação envolvem a coagulação dos compostos em fases distintas. São métodos eficientes para tratamento de efluentes, entretanto apenas separam os corantes têxteis da fase líquida, não ocorrendo nenhum processo degradativo (HAMAD; SAIED, 2021; RASHID *et al.*, 2021).

Métodos físico-químicos são eficientes para remoção da cor dos efluentes, contudo, o alto custo e a produção e disposição de lodos são pontos negativos. Estes métodos demandam equipamentos e reagentes específicos, além de não garantirem a redução da toxicidade (HAMAD; SAIED, 2021; RASHID *et al.*, 2021).

Os métodos biológicos envolvem o uso de micro-organismos (fungos, bactérias e algas), de forma isolada ou associados em consórcio ou suas enzimas para descoloração dos efluentes. Estes sistemas têm um melhor custo-benefício, além de serem considerados ecologicamente corretos (BOHACZ, 2020; VARJANI *et al.*, 2020).

No Brasil o tratamento dos efluentes industriais são de responsabilidade da empresa. São regulamentados pela resolução 357 de 17 de março de 2005, alterada pela resolução 430 de 13 de maio de 2011, estabelecidas pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Os estados e municípios também podem estabelecer legislações e parâmetros a serem cumpridos. No ato de licenciamento a empresa deve informar ao órgão ambiental as substâncias que compõem o efluente gerado. Além disso, o lançamento dos efluentes nos corpos d'água precisam se enquadrar nos padrões estabelecidos e respeitar a capacidade suporte do corpo d'água em questão (CONAMA, 2011).

Os principais métodos utilizados pelas empresas têxteis envolvem o gradeamento para remoção de sólidos maiores, seguido de tratamento de coagulação e floculação ou tratamento biológico acoplado ou não a processos físico-químicos. Esses processos podem ser eficientes para a remoção da cor e sólidos em suspensão, entretanto o lodo gerado ainda requer disposição em aterros sanitários ou incineração (FONTANA *et al.*, 2020; RAMOS *et al.*, 2021).

2.5. Biorremediação de corantes e efluentes têxteis por fungos

A biorremediação é um dos métodos biológicos utilizado para remover poluentes ambientais de solos, sedimentos, cursos d'água e efluentes. Envolve a transformação enzimática ou a adsorção dos poluentes pelos micro-organismos e tem demonstrado vantagens na eficiência, geração de subprodutos, segurança e custo do processo (GIOVANELLA *et al.*, 2020; SHARMA; DANGI; SHUKLA, 2018).

Um dos problemas na biodegradação dos efluentes têxteis é a presença de sais (NaNO_3 , NaCl e Na_2SO_4 , entre 40 e 100 g/L) usados no processo de tingimento do tecido. A alta concentração afeta negativamente a performance dos micro-organismos e enzimas empregados no processo (IMRAN *et al.*, 2015).

Fungos marinhos com tolerância a sais podem apresentar vantagens no tratamento destes efluentes salinos. A principal vantagem destes micro-organismos é a estabilidade e atividade de suas enzimas em condição salina quando comparados aos organismos terrestres. No estudo de Vieira *et al.* (2021) a condição salina resultou em uma melhor performance de descoloração do corante têxtil RBRR por consórcio microbiano composto por fungos de origem marinha em comparação com a condição não salina.

Os fungos têm capacidade de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono, incluindo o diesel, corantes sintéticos, hidrocarbonetos aromáticos, pesticidas e outros (YAKOP; TAHA; SHIVANAND, 2019). A biorremediação de corantes têxteis é feita por meio de enzimas que oxidam e reduzem a molécula do corante. Além disso, os fungos podem remover de forma física, adsorvendo em seu micélio as moléculas desses poluentes ambientais (CHOI *et al.*, 2021).

Diversos trabalhos reportados na literatura investigaram a descoloração e destoxificação de corantes e efluentes têxteis por micro-organismos (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2015; IMRAN *et al.*, 2015). A taxa de degradação/adsorção depende da molécula do corante e das características do efluente. No estudo de Singh e Singh (2017) o fungo utilizado, *Aspergillus flavus*, foi capaz de descolorir 77 % do corante vermelho ácido e 62 % do corante azul básico num período de 10 dias. Outra forma de descontaminar e descolorir corantes é com o uso de enzimas purificadas. Ashrafi *et al.* (2013) utilizaram lacase purificada e observaram descoloração entre 58 % e 97 % de 13 corantes de diferentes classes. A principal vantagem do uso de enzimas purificadas e caldos enzimáticos é a redução do tempo. Além disto, pode-se otimizar os processos manipulando as condições físico-químicas (DUARTE *et al.*, 2018b; SHARMA; DANGI; SHUKLA, 2018).

2.5.1. Adsorção de corantes têxteis por fungos

A adsorção é um método com alta eficiência para remoção de corante dos efluentes, é um método físico simples de transferência de massa. Podem ser utilizadas matrizes como carvão ativado, quitina, celulose, biomassa microbiana e biomassa vegetal (RASHID *et al.*, 2021). Os fungos são boas opções para adsorção de corantes têxteis, pois é possível definir condições ótimas para atingir maior eficiência de adsorção. Hamad e Saied (2021) reportaram a remoção por meio de adsorção de 98% do corante vermelho do congo por *Aspergillus niger*.

A adsorção pode ocorrer em três estágios: (1°) deposição extracelular, (2°) adsorção na superfície da célula e (3°) acúmulo intracelular. Cada material adsorvente tem uma cinética diferente de adsorção, dependente de vários fatores. Nos casos em que ocorre a degradação intracelular do corante, a concentração dentro da célula rege a velocidade de transferência de massa adsorvida do exterior para o interior da célula, podendo requerer tempos diferentes para a remoção do corante do meio (RASHID *et al.*, 2021; SYAFI UDDIN; FULAZZAKY, 2021).

Os fungos também podem ser utilizados na forma de pellet micelial, um tipo de grânulo formado em meio líquido pelo crescimento das hifas entrelaçadas sob condições ideais de agitação, fluxo de oxigênio e nutrientes. Os pellets podem ser formados a partir de uma junção de esporos ou de um único esporo, dependendo do fungo. De acordo com Li *et al.*, (2020) pellets de *Aspergillus niger* ZJUBE-1 foram capazes tanto de adsorver quanto de degradar corante têxtil vermelho do congo em tratamentos com alta salinidade e acidez, demonstrando o potencial desta técnica para aplicação de pellets miceliais em processos de biorremediação.

2.5.2. Degradação enzimática de corantes têxteis por fungos

A degradação de poluentes ambientais por fungos filamentosos pode ocorrer por duas vias principais: o sistema ligninolítico e/ou o sistema citocromo P450 + epóxido hidrolases. Existem ainda, algumas vias metabólicas mais específicas como a mediada por azoredutases (observada na degradação de corantes tipo azoicos) e a *horseradish* peroxidase (observada na degradação de diferentes tipos de corantes) (BOHACZ, 2020; HUSSAIN *et al.*, 2020; KUMAR; CHANDRA, 2020; PRICELIUS *et al.*, 2007).

A lignina é um dos constituintes da biomassa vegetal altamente recalcitrante devido a sua composição. É o polímero complexo mais abundante na natureza, tem caráter aromático e é constituído de unidades guaiacil, siringil e hidroxifenil ligadas aleatoriamente por ligações tipo éster e éter (ALI *et al.*, 2021; KUMAR; CHANDRA, 2020). Os fungos produzem

diferentes enzimas que agem na transformação da lignina, incluindo oxidoredutases, ligninases, liases, dehalogenases e hidrolases. As enzimas ligninolíticas podem oxidar outros compostos aromáticos que não a lignina, o que pode ser aplicado na degradação de poluentes como os corantes têxteis (BHATIA *et al.*, 2017; SHARMA; DANGI; SHUKLA, 2018). As principais enzimas do sistema ligninolítico são as lacases, lignina peroxidases, manganês peroxidases e peroxidase versátil. Contudo, existem outras enzimas que auxiliam no processo de degradação incluindo a celobiose desidrogenase, aril álcool oxidase, quinona redutase, glioxal oxidase, glicose oxidase, piranose-2-oxidase, feruloil esterase, lipases, xilanases, catecol-2,3,-dioxigenase (KUMAR; CHANDRA, 2020). O citocromo P450 é um complexo enzimático localizado predominantemente na membrana celular de mitocôndrias e retículos. Compreende várias oxidases, com uma versatilidade catalítica ampla com capacidade para degradar hidrocarbonetos, fármacos, hormônios, corantes, entre outros compostos (SHARIFIAN *et al.*, 2020).

As enzimas utilizadas para degradação de corantes têxteis podem variar conforme o fungo utilizado e condições aplicadas. No estudo reportado por Lopes *et al.* (2020) os fungos *Pleurotus eryngii* PLE 05 produziram ligninases e hidrolases termotolerantes capazes de descolorir 100% de índigo carmine em 24 horas. De acordo com Bohacz (2020), fungos do gênero *Trichoderma* produziram enzimas não ligninolíticas (xilanases, *horseradish* peroxidase, superóxido dismutase e peroxidases) durante a descoloração do corante RBBR. Vieira *et al.* (2021), estudando a biorremediação do mesmo corante, observaram genes associados à descoloração, degradação e destoxificação, responsáveis pela síntese de enzimas das classes peroxidases, dioxigenases, monooxigenases, glioxalases, epóxi-hidrolases. Bonugli-Santos *et al.* (2016) observaram a produção das enzimas manganês peroxidases e lacases por *Peniophora* sp. CBMAI 1063 detectadas nos estágios iniciais de degradação do corante preto reativo 5.

Apesar do diversificado arsenal enzimático dos fungos para a degradação de poluentes ambientais, o uso de consórcios microbianos pode ampliar a diversidade metabólica e, em consequência, melhorar a descoloração e destoxificação de corantes têxteis quando comparados a culturas puras (LADE *et al.*, 2012).

A descoloração do corante ocorre facilmente requerendo apenas a modificação/degradação do grupo cromóforo, entretanto, isso não garante a redução da toxicidade do composto. Para isto, é necessária a degradação e modificação da molécula poluente em subprodutos não tóxicos, ressaltando a importância de verificar além da descoloração, a destoxificação dos tratamentos (BHATIA *et al.*, 2017; SHARMA; DANGI; SHUKLA, 2018). A degradação enzimática da molécula do corante ocorre em várias etapas,

que podem ser monitoradas e quantificadas por meio de equipamentos que medem a composição e descoloração dos compostos em espectros de infravermelho, UV-visível, massa (BHATIA *et al.*, 2017). Já a destoxificação é mensurada com a exposição de organismos (bioindicadores) ao poluente ou produtos de degradação. Entre esses bioindicadores, os principais são microcrustáceos (*Daphnia magna* e *Artemia salina*), plantas (*Lactuca sativa*, *Eruca sativa*, *Cucumis sativus*) e bactérias (*Aliivibrio fischeri*). A partir da exposição são avaliados parâmetros como mortalidade, motilidade, germinação, luminosidade, alongamento de raiz e, conforme os resultados, pode-se inferir se a toxicidade é baixa, moderada ou alta (VIEIRA *et al.*, 2021).

2.6. Biodegradação de índigo carmine

O tratamento de efluentes contendo índigo carmine é complexo e geralmente há a associação de mais de um método para o tratamento. O melhor custo-benefício envolve um método físico-químico (adsorção, filtração ou oxidação) com um método biológico antecedendo ou sucedendo estes processos (BENTO *et al.*, 2020; CHOI *et al.*, 2021; YOUNES *et al.*, 2020).

Diversos estudos reportam a capacidade de fungos para a degradação de índigo carmine. Huy *et al.* (2020) observaram 77% de descoloração de índigo carmine mediado por lacase do fungo *Fusarium oxysporum* HUIB02 em 6 dias. Li *et al.* (2015b) reportaram 90% de descoloração do índigo carmine em 6 horas com extrato enzimático de manganês peroxidase produzida por *Phanerochaete chrysosporium* CICC 40719. Em estudos similares, Bankole *et al.* (2017) observaram descoloração de 99% de corante índigo em 5 dias pela levedura *Diutina rugosa*.

A degradação do índigo carmine pode ocorrer por oxidação ou redução. A dupla ligação do carbono que corresponde a região cromófora da molécula pode ser oxidada em grupo cetona (C=O), que geralmente resulta em duas moléculas de insatina ou insatina ácido sulfônico, as quais podem continuar sendo degradadas até CO₂ e NH₄⁺ (**Figura 2**). A redução enzimática da região cromófora pode ocorrer com a substituição da ligação C=C por grupos -CH (HAO *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2015a). A degradação do índigo carmine pela *horseradish* peroxidase ocorre pela oxidação da ligação C=C que é substituída por um grupo -OH podendo chegar à mineralização total (TERRES *et al.*, 2014) (**Figura 2**). Além destas, podem existir outras vias de degradação ainda não descritas.

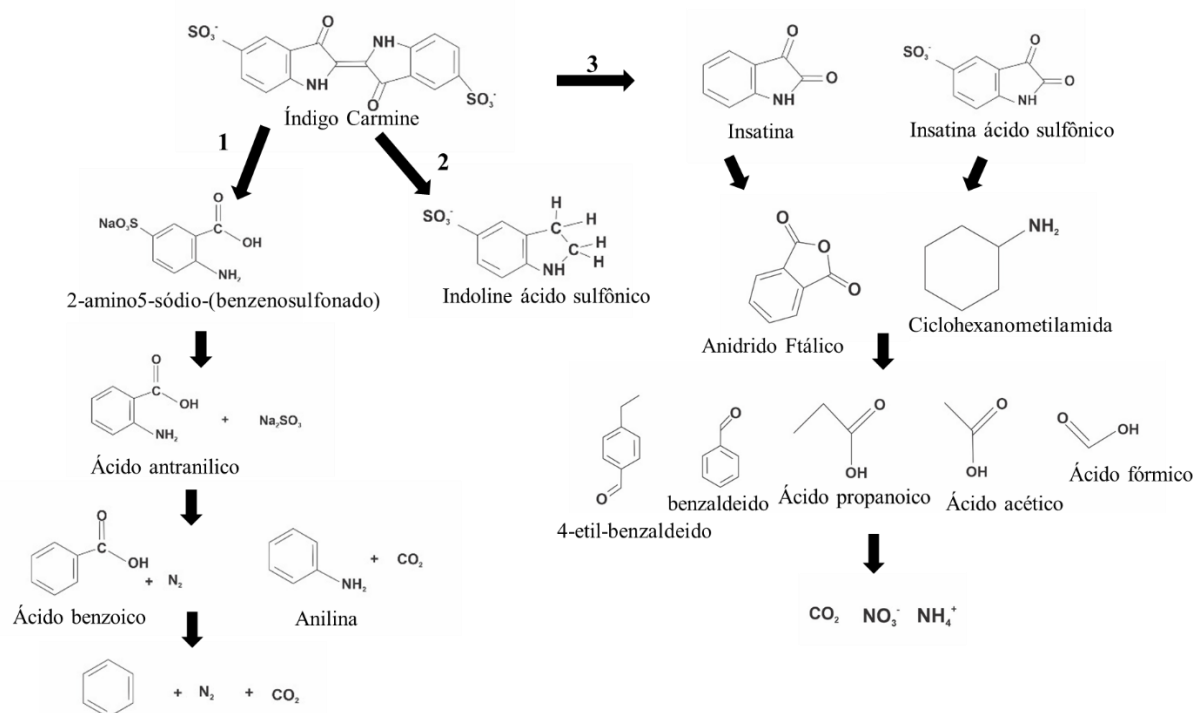


Figura 2. Possíveis vias de degradação sugeridas na literatura para índigo carmine. Via 1 de degradação oxidativa mediada por *horseradish* peroxidase, via 2 via redutora, via 3 demonstra uma via oxidativa. **Fonte:** a autora.

2.6.1. Metabólitos de degradação do índigo carmine

Após o processo de degradação do corante índigo carmine, os metabólitos resultantes podem variar conforme o processo utilizado. São utilizadas análises de cromatografia líquida ou gasosa, associadas à espectrômetro de massas para avaliar estes compostos, assim como análises de mudanças na curva espectrofotométrica de UV e IR, todas capazes de auxiliar na elucidação da estrutura química dos metabólitos.

Bankole *et al.* (2017) observaram a formação de ciclopentanona e 2-dihidro-3H-indol-3-ona após a degradação do índigo carmine, com a degradação sendo mediada por NADH-DCIP redutase e ligninases. Um composto frequentemente observado é a insatina, que é formada a partir da oxidação da molécula do corante, seja por oxidação enzimática, como registrado por Li *et al.* (2015a), ou por vias de oxidação química, como observado por Ramya, Anusha e Kalavathy (2008). Outros compostos intermediários já observados são o ácido antranílico (RAMYA; ANUSHA; KALAVATHY, 2008), indol sulfonado (CANO *et al.*, 2011), o sódio benzeno sulfato, ácido antranílico, ácido benzoico e anilina (TERRES *et al.*, 2014; HAO *et al.*, 2017). Pelos metabólitos reportados na literatura, existem vias específicas de oxidação e

redução da molécula de índigo carmine que podem ser determinadas através de cromatografia gasosa ou líquida, que possibilitam avaliar o perfil de metabólitos intermediários de degradação produzidos.

3. OBJETIVOS

Avaliar o potencial de fungos isolados de amostras de sedimento marinho antártico para destoxificação e descoloração do corante têxtil índigo carmine em consórcio e associados a basidiomicetos.

3.1. Objetivos Específicos

- Caracterizar os gêneros dos isolados por meio de taxonomia molecular e análises morfológicas.
- Avaliar os fungos isoladamente bem como em consórcios quanto à capacidade de destoxificação e descoloração do corante têxtil índigo carmine.
- Avaliar o desempenho na destoxificação e descoloração do melhor consórcio combinado com basidiomicetos marinho da costa brasileira e de origem Antártica.
- Avaliar os metabólitos de degradação do índigo carmine em cromatografia gasosa associada a espectrômetro de massa (GC-MS).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Corante têxtil índigo carmine

O corante têxtil índigo carmine ($C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$) (**Figura 3**) utilizado nos estudos foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich e possui 85% de pureza (lote MKCC9748, validade 23/05/2023).

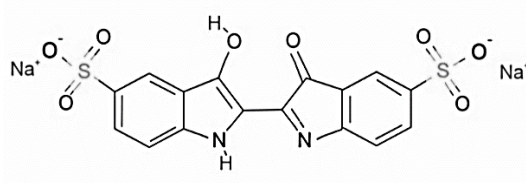


Figura 3: Estrutura química do corante índigo carmine. **Fonte:** a autora.

4.2. Fungos marinhos antárticos

No presente trabalho foram utilizados 20 fungos filamentosos isolados seletivamente (em estudos anteriores do grupo de pesquisa) a partir de duas amostras de sedimentos marinhos coletados na Antártica (OPERANTAR XXXVII, dezembro de 2018) em diferentes profundidades: SMWB1 (95,4 m) e SMEACF1 (60 m) (**Tabela 1**). Destes, um total de 9 isolados foram obtidos após enriquecimento utilizando o corante índigo sulfuroso (cedido pela empresa TEXPAL – Valinhos, SP) e 11 isolados foram obtidos a partir do enriquecimento com serragem.

Os fungos foram reativados em meio malte 2% (MA2 - extrato de malte 20 g; ágar bacteriológico 15 g; água destilada 1.000 mL), cultivados a 15 °C e mantidos nestas condições até a realização dos ensaios. Os isolados foram preservados em culturas de trabalho por dois métodos distintos (criopreservação a -80°C e Castellani).

Tabela 1. Profundidade das amostras de sedimento marinho e método de enriquecimento utilizado para o isolamento dos fungos marinhos antárticos utilizados no trabalho.

n	Fungos	Origem	
		Amostra	Enriquecimento
1	D2A	SMWB1 (95,4 m)	Corante índigo sulfuroso
2	D2B		
3	D2C		
4	D2D		
5	D2P		
6	J2A		Serragem
7	J2B		
8	J2C		
9	J2D		
10	J2E1		
11	J2E2		
12	J2F		
13	D8A	SMEACF1 (60 m)	Corante índigo sulfuroso
14	D8B		
15	D8C1		
16	D8C2		
17	J8A		Serragem
18	J8B1		
19	J8B2		
20	J8D		

4.3. Caracterização taxonômica

4.3.1. Caracterização morfológica

Para análise das características morfológicas inicialmente foi realizada uma triagem macroscópica. A micromorfologia dos 20 fungos marinhos antárticos foi avaliada a partir da técnica de microcultivo, com base nas estruturas reprodutivas dos isolados. Os isolados foram subcultivados em condições de microcultivo usando o meio MA2 e foram mantidos por 14 dias

à 15 °C. Após o crescimento as lamínulas foram retiradas e coradas com azul de algodão, seguida de observação em microscopia de luz (Leica Microsystems).

4.3.2. Caracterização molecular

Para a caracterização molecular, foi utilizado como marcador taxonômico a região ITS do *operon* ribossomal. O DNA foi extraído a partir das colônias esporuladas utilizando o método CTAB, de acordo com Möller *et al.* (1992) e Gerardo *et al.* (2004). A região ITS foi amplificada com os *primers* ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e a purificação do produto de PCR foi realizada com exonuclease1 e fosfatase alcalina (Thermo Scientific, Estados Unidos) conforme Bonugli-Santos *et al.* (2010). Os *amplicons* foram preparados em tubos de 0,2 mL, diluídos em água ultrapura, numa proporção de 50 ng/μL de amostra e 5 pmol/ μL de *primer*. O sequenciamento foi então realizado em empresa especializada pelo método de Sanger (ABI3130 DNA Analyser – Applied Biosystems).

Para a geração dos *contigs* foi utilizado o software Bioedit Sequence Alignment Editor (Versão 7.2.5), os *contigs* criados foram comparados com sequências homólogas por meio de BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) utilizando o banco de dados do NCBI (*Nation Center for Biotechnology Information*). As sequências foram alinhadas usando MUSCLE (*multiple comparison by logexpectation*) com *cluster* tipo *Neighbour Joining* e editadas no software MEGAX. A filogenia foi realizada utilizando o método de *Maximum Composite Likelihood* (MCL) (KUMAR *et al.*, 2018) com modelo de substituição *General Time Reversible* (NEI; KUMAR, 2000) e Bootstrap de 1.000 réplicas no software MEGAX.

4.4. Temperatura ótima de crescimento

Para a determinação da temperatura ótima de crescimento, os fungos foram cultivados em meio MA2 por 7 dias em quatro temperaturas diferentes: 15, 20, 25 e 30 °C. Os isolados foram inoculados por meio de uma suspensão de esporos na concentração de 2 a 3x10⁶ esporos/mL, sendo inoculados 10 μL no centro da placa, não sendo realizado nenhum tipo de espalhamento. Após o cultivo, a área de crescimento foi foto-documentada e posteriormente mensurada com auxílio do programa ImageJ utilizando o modo de desenho livre. A área de

crescimento (cm^2) é determinada pelo programa usando uma relação de pixels da imagem com a área mensurada (ABRAMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004).

4.5. Antagonismo entre os isolados

O antagonismo entre os isolados foi avaliado por meio de confronto direto (DENNIS; WEBSTER, 1971 e VIEIRA *et al.*, 2021). Para isto, foi utilizado o meio MA2, o qual foi cortado com auxílio de um bisturi esterilizado, formando cinco extremidades de 1,5 cm de largura, com distância entre si de 4 cm (**Figura 4**).

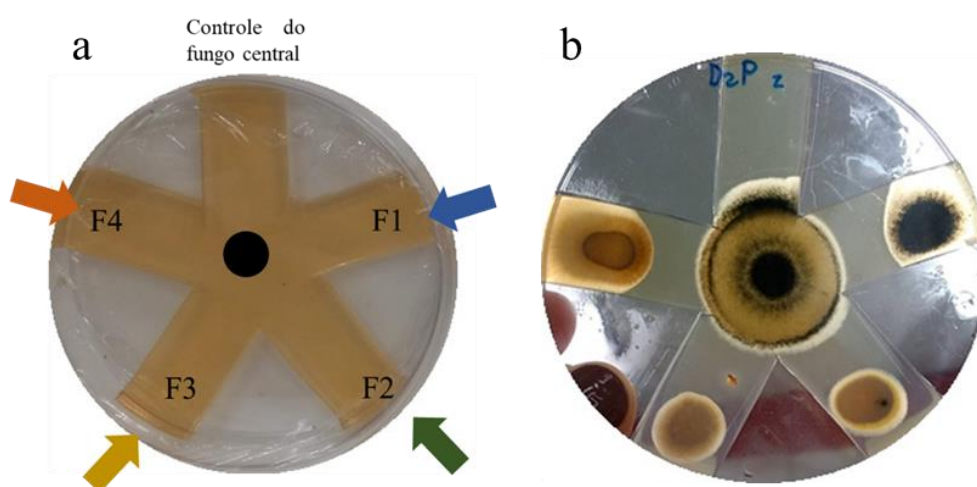


Figura 4. Figura demonstrativa do teste de inibição entre fungos marinhos antárticos (a), fungos diferentes inoculados nas extremidades (setas coloridas) e extremidade livre (controle). Imagem do ensaio realizado para o isolado D2P (b) cultivado em meio MA2 por 14 dias a 20 °C. **Fonte:** a autora.

Os inóculos foram preparados por suspensão de esporos na concentração de 1×10^6 esporos/mL e a partir desta foi inoculado o volume de 10 μL . Um isolado foi inoculado no centro da placa, e quatro isolados inoculados nas extremidades adjacentes, sendo deixada uma extremidade livre como controle de crescimento do isolado central. As placas foram incubadas à 20 °C por 14 dias e avaliadas quanto a presença ou não de inibição.

4.6. Descoloração e destoxificação do corante têxtil índigo carmine pelos fungos marinhos

Para os experimentos de descoloração e destoxificação os fungos foram cultivados em caldo MA2 acrescido de 100 mg/L do corante índigo carmine (SIGMA) autoclavado a 121 °C

por 15 min. Os fungos foram inoculados em forma de esporos na concentração de 1×10^6 esporos/mL. O meio inoculado foi incubado à 20 °C por 7 dias no escuro. Após a incubação, o micélio foi filtrado a vácuo (filtro qualitativo unifil – 80 g/m²) e o sobrenadante utilizado para mensurar a descoloração e a fitotoxicidade.

4.6.1. Descoloração

A descoloração foi avaliada por meio de espectrofotometria (610 nm). A porcentagem de descoloração foi calculada por meio da **equação 1**, conforme Bonugli-Santos, Durrant e Sette (2012).

$$\text{Descoloração (\%)} = \frac{\text{Abs média do controle} - \text{Abs do ensaio}}{\text{Abs média do controle}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

4.6.2. Fitotoxicidade

A destoxificação foi realizada utilizando o método de fitotoxicidade com sementes de *Cucumis sativus* conforme Wang (2001) com modificações. O total de 15 sementes foram dispostas em papel filtro embebido com 3 mL do sobrenadante e incubados por 5 dias à 24 °C. Após o período de incubação, a raiz (**r**) e hipocótilo (**h**) foram mensurados e a porcentagem de inibição foi calculada. Água destilada foi utilizada como controle negativo e ZnSO₄ (0,05 M) foi utilizado como controle positivo de inibição. As porcentagens de toxicidade e destoxificação foram calculadas por meio das **equações 2 e 3** respectivamente, considerando o crescimento de raiz (r) e hipocótilo (h) das sementes em centímetros.

$$\text{Toxicidade (\%)} = \frac{r+h \text{ (cm) do controle negativo} - r+h \text{ (cm) do ensaio}}{r+h \text{ (cm) do controle negativo}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

$$\text{Destoxificação (\%)} = \text{toxicidade do controle} - \text{toxicidade do ensaio} \quad \text{Equação 3}$$

4.7. Estruturação dos consórcios fúngicos

A estruturação dos consórcios foi realizada considerando o potencial de descoloração e destoxificação, a identificação dos fungos, temperatura ótima de crescimento e o antagonismo entre os isolados. Os fungos J2C, J2F e D8C2 foram selecionados para compor a base dos consórcios, sendo a variação entre os consórcios definidos pelos isolados J2A, D2C e D2P que quando combinados com os outros fungos base formaram os consórcios 1, 2 e 3

respectivamente (Tabela 2), os isolados escolhidos apresentaram os melhores resultados de descoloração e de destoxificação.

Tabela 2: Isolados utilizados para compor os consórcios testados, selecionados com base na morfologia, antagonismo e capacidade de descolorir e destoxificar o corante índigo carmine.

Consórcio 1	Consórcio 2	Consórcio 3
J2A	D2C	D2P
J2C	J2C	J2C
J2F	J2F	J2F
D8C2	D8C2	D8C2

4.8. Ensaios de degradação do índigo carmine pelos consórcios

Os consórcios listados na **Tabela 2** foram submetidos aos ensaios de descoloração e destoxificação realizados como reportado no item 4.6. Para isto, Erlenmeyers contendo 50 mL de Meio Mínimo mineral (MM1- em 1000 mL água destilada: 3 g Na₂HPO₄; 2,5 g NaH₂PO₄; 1 g (NH₄)₂SO₄; 0,7 g KCl; 1 mL solução de micronutrientes (4 g MgSO₄; 0,2 g Fe₂SO₄; 0,2 g MnCl₂) acrescido de 0,1 g/L de corante índigo carmine (SIGMA) foram preparados. A estes foi acrescentado 0,1% de glicose e os fungos foram inoculados por meio de uma suspensão de esporos na concentração de 1x10⁶ esporos/mL. Os ensaios foram incubados por 7 dias a 20 °C a 140 rpm e posteriormente o sobrenadante foi filtrado à vácuo (filtro qualitativo unifil – 80 g/m²). Os experimentos foram realizados em quintuplicata.

4.8.1. Avaliação da presença de enzimas

Os sobrenadantes foram utilizados para avaliação da presença de enzimas ligninolíticas (lacases, lignina peroxidase e manganês peroxidase). A reação foi realizada em cubeta, com volume final de 1 mL. Uma unidade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol de substrato por minuto. A atividade foi expressa em U L⁻¹ do caldo e os cálculos foram realizados conforme a **equação 4**, de acordo com Bonugli-Santos, Durrant e Sette (2012):

$$U (L^{-1}) = \frac{\Delta A * V * 10^6}{\epsilon * R * t} \text{ Equação 4}$$

ΔA = diferença entre a absorbância final e inicial

V = volume de reação (0,001 L em todos os ensaios)

10^6 = fator de conversão do volume em mols de ϵ para μmols

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

R = quantidade de caldo enzimático (L)

t = tempo de reação (min)

4.8.1.1. Lacase

Para presença de lacase foi utilizada a reação da enzima com o 2,2-azino-bis-etilbenthiазolina (ABTS). O ABTS oxidado resulta no aumento da absorbância, que foi mensurada após 10 min de reação a 37 °C, no comprimento de onda 410 nm. O meio de reação foi composto de 0,3 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5); 0,1 mL de solução ABTS 0,03% ($\epsilon = 36.000 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e 0,6 mL do caldo enzimático.

4.8.1.2. Lignina Peroxidase

Para presença de lignina peroxidase foi observada a reação da enzima com álcool veratrílico ($\epsilon = 9.300 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), que é oxidado resultando em aldeído veratrílico, este foi mensurado após 10 minutos de reação no comprimento de onda 310 nm. O meio de reação foi composto de 0,2 mL de tampão acetato de sódio + álcool veratrílico 10 mM, 0,2 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 0,6 mL de caldo enzimático.

4.8.1.3. Manganês Peroxidase

Para presença de manganês peroxidase foi observada a reação com o malonato de sódio, o complexo resultante Mn^{+3} -malonato ($\epsilon = 11.590 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi mensurado após 5 min de reação, no comprimento de onda 270 nm. O meio de reação foi composto de: 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.

4.8.2. Adsorção do corante pelo micélio inativado

Para avaliar a adsorção do corante pelo micélio dos fungos, foi utilizada a técnica de micélio inativado conforme Vieira *et al.* (2021) com modificações, como abaixo descrito.

4.8.2.1. Preparo da biomassa

Os fungos componentes dos consórcios foram inoculados em MM1 + 0,1% de glicose na concentração de 1×10^6 esporos/mL e incubados a 20 °C e 140 rpm por 7 dias. Após a incubação, o micélio foi inativado por meio de autoclavação a 121 °C por 45 min.

4.8.2.2. Ensaio de adsorção

Após o preparo da biomassa foi adicionado o corante índigo carmine na concentração de 0,1 g/L e foi incubado a 20 °C a 140 rpm por 7 dias. O sobrenadante foi filtrado à vácuo (filtro qualitativo unifil – 80 g/m²) e analisado em espectrofotômetro a 610 nm. A porcentagem (%) de adsorção foi calculada conforme a **equação 5**:

$$\text{Adsorção (\%)} = \frac{\text{abs controle} - \text{abs consórcio}}{\text{abs controle}} * 100 \quad \text{Equação 5}$$

4.9. Descoloração e destoxificação do índigo carmine pelos consórcios fúngicos associados a basidiomicetos antártico e marinho da costa brasileira

Os basidiomicetos adicionados aos consórcios foram isolados em trabalhos prévios do grupo de pesquisa. O isolado *Pholiota* sp. CRM 2306 foi obtido a partir de amostra de solo de recuo da Geleira Collins na ilha King George, na Antártica (SANTOS; MEYER; SETTE, 2020). O fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi isolado de esponja marinha da costa brasileira (MENEZES *et al.*, 2010) e apresenta capacidade de produção de enzimas ligninolíticas, bem como para degradação do corante têxtil RBBR e Preto Reativo 5 já publicados em outros trabalhos do grupo (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2010; BONUGLI-SANTOS; DURRANT; SETTE, 2012; BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2016; BRENELLI *et al.*, 2019; FONTES *et al.*, 2021; MAINARDI *et al.*, 2017; OTERO *et al.*, 2017).

O preparo dos ensaios (condições de cultivo e inoculação) (**Tabela 3**) foi realizado como descrito no item 4.8. Para a inoculação dos basidiomicetos foram utilizados 3 plugs cilíndricos de 5 mm de diâmetro de ágar + micélio, os quais foram adicionados aos experimentos após 48

horas de incubação, para que os fungos do consórcio se desenvolvessem em massa micelial. Após 120 horas (totalizando 7 dias de incubação) os consórcios foram centrifugados a 10.000 rpm (13,416 g) a 4 °C por 15 min para separação do micélio e do sobrenadante (Vieira *et al.*, 2021). O sobrenadante foi removido para um tubo tipo falcon e utilizado para determinação do pH e para avaliação da descoloração e destoxificação.

Tabela 3. Descrição dos consórcios com inclusão dos basidiomicetos.

C2	C2 PEN	C2 PHO
D2C	D2C	D2C
J2C	J2C	J2C
J2F	J2F	J2F
D8C2	D8C2	D8C2
	<i>Peniophora</i> sp.	<i>Pholiota</i> sp.

4.9.1. *Descoloração do corante índigo carmine pelos consórcios fúngicos*

Para avaliar a descoloração foram preparadas três alíquotas de cada repetição, 200 µL de amostra para 1800 µL de água destilada. As diluições foram avaliadas em espectrofotômetro (Shimadzu, Japão) no comprimento de onda 610 nm. O cálculo de descoloração foi realizado conforme item 4.6.1.

4.9.2. *Fitotoxicidade do corante índigo carmine após tratamento com os consórcios fúngicos*

Para avaliar a fitotoxicidade dos diferentes tratamentos o sobrenadante foi primeiro diluído 1:1, sendo 2 mL de sobrenadante para 2 mL de água destilada, e o volume filtrado em membrana de 0,22 µm (KASVI). As condições de incubação e cálculo de toxicidade e destoxificação foram realizados conforme item 4.6.2.

4.9.3. *Análise de biomassa dos consórcios com adição dos basidiomicetos *Pholiota* sp. e *Peniophora* sp.*

A biomassa foi avaliada conforme Vieira *et al.* (2021), onde tubos tipo falcon foram secos em estufa a 105 °C até obtenção de massa constante, sendo anotado o peso dos tubos vazios e secos. Nesses mesmos tubos os micélios fúngicos (biomassa) foram centrifugados a 10.000 rpm (13,416 g) e a 4 °C por 15 min. Após a remoção do sobrenadante, os tubos contendo os micélios foram levados a estufa a 105 °C até peso constante. Os tubos + micélios secos foram pesados e a biomassa foi calculada como descrito na **equação 6**.

$$\text{Biomassa (g)} = \text{peso tubo com micelio} - \text{peso tubo vazio} \quad \text{Equação 6}$$

4.9.4. *Análise de metabólitos de degradação por GC-MS*

4.9.4.1. *Extração e preparo das amostras*

A avaliação dos metabólitos de degradação foi feita para os tratamentos controle, C2, C2 PEN e C2 PHO. A extração dos metabólitos foi realizada com acetato de etila (>99,5% pureza – SIGMA-ALDRICH), onde 20 mL de sobrenadante foram adicionados a um tubo falcon. Em seguida 10 mL de acetato de etila foram adicionados e a mistura levada ao vórtex por 5 minutos. Após a agitação, o conteúdo do tubo foi colocado em um funil de separação e deixado por 5 minutos em decantação. A parte de sobrenadante foi coletada e a parte de acetato de etila foi deixado no funil. O processo com o acetato de etila foi repetido uma vez e a mistura foi adicionada ao funil de decantação com os 10 mL de acetato anteriores e deixados por 5 minutos para decantação.

A seguir foram separadas as frações de sobrenadante (20 mL) e de acetato de etila (20 mL) em tubos diferentes, a esta última foi adicionado 1,5 g de Na₂SO₄ e o material foi centrifugado por 3 min a 5.000 rpm, 25 °C para remoção do resíduo de sobrenadante na fase do solvente. O solvente foi filtrado em membrana de 0,22 µm e os tubos foram levados ao concentrador a 40 °C até a evaporação total da parte líquida. Os extratos foram suspensos com 1 mL de acetato de etila e devidamente carregados nos frascos para injeção no cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa (GC-MS).

4.9.4.2. Análise de GC-MS

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 minutos 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.

4.10. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância (one-way ANOVA) com $p < 0,10$ para fitotoxicidade do item 4.9.2, e $p < 0,05$ nas demais análises: temperatura ótima (item 4.4), descoloração (itens 4.8 e 4.9.1), fitotoxicidade (item 4.8), adsorção (item 4.8.2) e biomassa seca (item 4.9.3), usando o programa em GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Estados Unidos).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização taxonômica

As análises morfológicas permitiram inferir o gênero de 50% dos isolados (**Figura 5**), que foi confirmado posteriormente com a análise de filogenia molecular utilizando o marcador ITS. Com esse mesmo marcador taxonômico foi definido o gênero dos outros isolados não identificados pela morfologia. Contudo, para alguns dos fungos estudados a taxonomia molecular não apresentou resolução suficiente para definir um gênero, não sendo possível distinguir entre dois gêneros prováveis (**Tabela 4**). Os dados de taxonomia molecular (similaridade de sequências e filogenia) estão apresentados nos Apêndices A e B.

Tabela 4. Identificação dos isolados de sedimento marinho antártico com base em micromorfologia e marcador molecular ITS.

Isolado	Táxon	Método de identificação
J2A	<i>Penicillium</i> cf. <i>oxalicum</i>	Morfologia e Molecular
J2B	<i>Leuconeurospora</i> sp.	Molecular
J2C	<i>Leuconeurospora</i> sp.	Molecular
J2D	<i>Geomyces/Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia e Molecular
J2E1	<i>Aspergillus</i> cf. <i>creber</i>	Molecular
J2E2	<i>Aspergillus</i> cf. <i>creber</i>	Molecular
J2F	<i>Geomyces/Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia e Molecular
J8A	<i>Geomyces/Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia e Molecular
J8B1	<i>Cosmospora/Pseudocosmospora</i>	Molecular
J8B2	<i>Cosmospora /Pseudocosmospora</i>	Molecular
J8D	<i>Trichoderma</i> sp.	Morfologia e Molecular
D2A	<i>Geomyces/Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia e Molecular
D2B	<i>Thelebolus</i> sp.	Molecular
D2C	<i>Penicillium</i> cf. <i>oxalicum</i>	Morfologia e Molecular
D2D	<i>Geomyces/Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia e Molecular
D2P	<i>Penicillium</i> cf. <i>oxalicum</i>	Morfologia e Molecular
D8A	<i>Geomyces/Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia e Molecular
D8B	<i>Thelebolus</i> sp.	Molecular
D8C1	<i>Aspergillus</i> cf. <i>sydowii</i>	Molecular
D8C2	<i>Aspergillus</i> cf. <i>sydowii</i>	Molecular

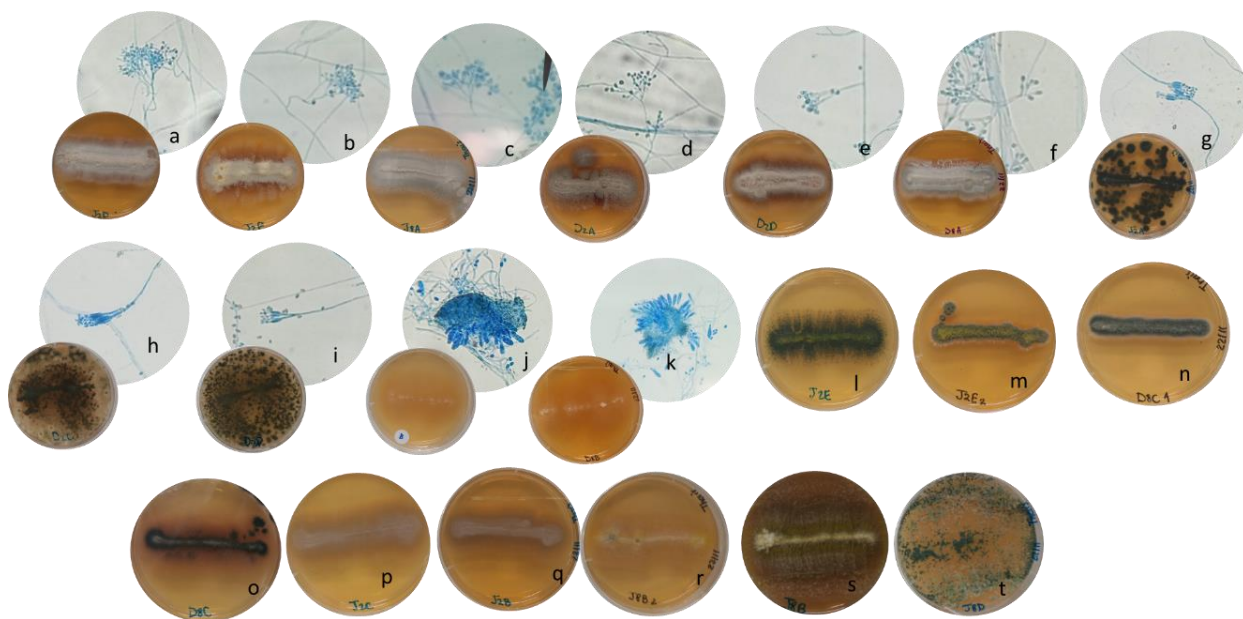


Figura 5. Macro e micromorfologia dos isolados marinhos antárticos. De (a - f) *Geomyces/Pseudogymnoascus* sp. (isolados da esquerda para a direita: J2D; J2F; J8A; D2A; D2D; D8A); (g - i) *Penicillium* sp. (J2A; D2C; D2P *P. cf. oxalicum*); (j-k) *Thelebolus* sp. (D2B; D8B); (l - o) *Aspergillus* sp. (J2E1; J2E2 *A. cf. creber*; D8C1; D8C2 *A. cf. sydowii*); (p-q) *Leuconeurospora* sp. (J2C; J2B); (r - s) *Cosmospora/Pseudocosmospora* sp. (J8B2; J8B1); (t) *Trichoderma* sp. (isolado J8D).
Fonte: a autora.

Dentre os 20 fungos avaliados foram identificados cinco gêneros, com possibilidade de expansão para sete ou nove. Um total de seis isolados foram associados ao gênero *Geomyces/Pseudogymnoascus* (J2D, J2F, J8A, D2A, D2D, D8A), quatro isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Aspergillus* (J2E1, J2E2, D8C1 e D8C2), três isolados (J2A, D2C e D2P) identificados como *Penicillium*, dois isolados foram afiliados ao gênero *Leuconeurospora* (J2B, J2C), *Cosmospora/Pseudocosmospora* (J8B1, J8B2) e *Thelebolus* (D2B, D8B) e um isolado (J8D) foi identificado como pertencente ao gênero *Trichoderma*.

Em relação a distribuição, foi observado que os representantes dos gêneros *Geomyces/Pseudogymnoascus*, *Aspergillus*, *Thelebolus* foram obtidos de ambas as amostras de sedimentos marinhos coletadas em diferentes ilhas do Arquipélago das Shetlands do Sul, Antártica: Ilha Deception (Whalers Bay, 95,5 m de profundidade) e Ilha Rei George (EACF, 60 m de profundidade). Os representantes dos gêneros *Penicillium* e *Leuconeurospora* foram isolados apenas a partir das amostras coletadas na Ilha Deception (95,5 m) e os gêneros

Cosmospora/Pseudocosmospora e *Trichoderma* apenas nas amostras coletadas na Ilha Rei George (60 m).

Além das questões das diferentes condições ambientais e características dos sedimentos marinhos nos pontos coletados (diferentes posições geográficas), a profundidade é um fator que limita a sobrevivência de organismos, tanto pela pressão quanto pela falta de nutrientes, visto que as temperaturas baixas reduzem a difusão de nutrientes e energia. Vários organismos marinhos psicrófilos são também piezófilos, uma vez que a cada 10 m de profundidade há um aumento de 1 atm (POLI *et al.*, 2017). Considerando a profundidade das amostras de origem destes isolados, eles podem ser considerados piezotolerantes (0,1 e 10 MPa).

Os gêneros *Geomyces/Pseudogymnoascus* compreendem 12 e 17 espécies respectivamente (<https://www.mycobank.org/>). São comumente encontrados em amostras da Antártica e têm sido reportados em vários estudos, incluindo alguns do nosso grupo de pesquisa (DUARTE *et al.*, 2018a; DURÁN *et al.*, 2019; OGAKI *et al.*, 2020; SANTOS; MEYER; SETTE, 2020; WENTZEL *et al.*, 2019). Espécies destes gêneros são comuns em ambientes frios, de alta altitude, são queratinolíticas, tolerantes a ambientes salinos e tendem a ser psicrófilas (ARENZ *et al.*, 2011; HAYES, 2012; KOCHKINA *et al.*, 2007; LUESCHOW *et al.*, 2019).

De acordo com Ding *et al.* (2016), fungos do gênero *Geomyces/Pseudogymnoascus* desempenham papel considerável na ciclagem de nutrientes na Antártica. Cabe destacar que em outros estudos do grupo, representantes dos gêneros *Geomyces/Pseudogymnoascus* foram os isolados mais abundantes recuperados das amostras de sedimentos marinhos e solo de recuo de geleira da Antártica (DUARTE *et al.*, 2018b; SANTOS; MEYER; SETTE, 2020; WENTZEL *et al.*, 2019). Não foi possível definir a qual dos dois gêneros os isolados pertencem, o uso de outros marcadores será necessário para isso. Conforme demonstrado por Lueschow *et al.* (2019) árvores concatenadas usando dois marcadores (ITS e MCM7) foram úteis para definir clados para espécies de *Pseudogymnoascus* e *Geomyces*, assim como no trabalho de Minnis e Lindner (2013), onde os autores utilizaram os marcadores ITS, LSU, MCM7, RPB2 e TEF1 para identificar os isolados destes gêneros.

Dentre os isolados que apresentaram similaridade com o gênero *Aspergillus*, dois (D8C1 e D8C2) foram agrupados com representantes da espécie *A. sydowii* e dois isolados (J2E1 e J2E1) como representantes da espécie *A. creber*, ambas as espécies pertencem a seção *Versicolores* e se encontram também no mesmo subclado (JURJEVIC; PETERSON; HORN,

2012). Linhagens de *A. sydowii* têm sido reportadas como produtoras de diversos compostos bioativos e ressaltam o potencial biotecnológico dessa espécie. No estudo de Cong *et al.* (2017) a linhagem *A. sydowii* MS-19 isolada de amostra da Antártica produziu ligninases com atividade enzimática entre 0 °C e 30 °C e foi capaz de utilizar lignina como única fonte de carbono. No estudo de Li *et al.* (2018) a linhagem marinha antártica *A. sydowii* SP-1 produziu diversos compostos com ação antibactericida. A espécie *A. creber* já foi recuperada de invertebrados marinhos antárticos (GODINHO *et al.*, 2019), de esponjas marinhas e corais (BOVIO *et al.*, 2018). Essa espécie já demonstrou capacidade de degradação do poluente 2,4-diclorofenol, conforme demonstrado por Nikolaivits *et al.* (2019).

Os isolados J2A, D2C e D2P apresentaram alta similaridade com a espécie *P. oxalicum*, todos foram isolados da mesma amostra, sendo um do enriquecimento com serragem e dois do enriquecimento com corante. Fungos do gênero *Penicillium* já foram isolados de diferentes amostras da Antártica, incluindo solos (DUARTE *et al.*, 2018b; DURÁN *et al.*, 2019; SANTOS; MEYER; SETTE, 2020; TOSI *et al.*, 2010), substratos marinhos (GONÇALVES *et al.*, 2013; OGAKI *et al.*, 2020), lagos (GONÇALVES *et al.*, 2012), gelo glacial (MENEZES *et al.*, 2020) e associados a outros organismos, como esponjas do mar (GODINHO *et al.*, 2019) e algas marinhas (LOQUE *et al.*, 2010). O gênero *Penicillium* aparece em proporções consideráveis nos trabalhos de isolamento, chegando a corresponder até 20% do total de isolados em determinados pontos. São espécies estudadas pela produção de diferentes metabólitos secundários, principalmente como produtores de enzimas e metabólitos secundários com potencial biotecnológico (AZMI; SEPPELT, 1998; CONG *et al.*, 2017; KOCHKINA *et al.*, 2014).

Dois dos fungos estudados (J8B1 e J8B2) foram agrupados com representantes dos gêneros *Cosmospora* e *Pseudocosmospora*, os quais compreendem mais de 90 espécies juntos (<https://www.mycobank.org/>). O marcador ITS também não mostrou resolução suficiente para distinguir entre esses gêneros, a região avaliada parece ser muito conservada para o grupo. *Cosmospora* e *Pseudocosmospora* são gêneros reportados como cosmopolitas, sendo encontrados com frequência em regiões tropicais. Isolados do gênero *Cosmospora* já foram obtidos a partir de amostras de solo e musgos da Antártica (DUARTE *et al.*, 2018b; DURÁN *et al.*, 2019; GONÇALVES *et al.*, 2012; ROSA *et al.*, 2020; WENTZEL *et al.*, 2019). A taxonomia deste grupo é complexa, com filogenia ainda não tão definida. De acordo com Herrera *et al.* (2013), foram utilizados 6 marcadores moleculares diferentes (ITS, LSU, MCM7, rpb1, tef1 e β - tubulina) para identificação de representantes desse gênero.

Os isolados J2B e J2C foram associados ao gênero *Leuconeurospora*, que compreende 5 espécies (<https://www.mycobank.org/>). Isolados desse gênero já foram encontrados em cavernas de morcegos, solo e em amostras antárticas (KOCHKINA *et al.*, 2014). A discussão taxonômica para este gênero ainda é complexa, indivíduos estão sendo reclassificados e novas espécies estão sendo descritas (MALLOCH *et al.*, 2016). De acordo com Malloch *et al.* (2016) apenas ITS não é suficiente para distinguir espécies do gênero *Leuconeurospora*, os autores reportaram no trabalho o uso de três marcadores moleculares (ITS, RPB1 e RPB2). Vaz *et al.* (2011) utilizaram os marcadores ITS e D1/D2 para identificação de fungos do gênero *Leuconeurospora*.

Os isolados D2B e D8C foram associados ao gênero *Thelebolus* que compreende 26 espécies (<https://www.mycobank.org/>). Isolados desse gênero são frequentemente encontrados em amostras antárticas e outros ambientes frios (DUARTE *et al.*, 2018b; DURÁN *et al.*, 2019; SANTOS; MEYER; SETTE, 2020; SAZANOVA *et al.*, 2019; TSUJI *et al.*, 2013; WENTZEL *et al.*, 2019). No presente trabalho, não houve resolução suficiente para definir a espécie dos isolados. De acordo com Hoog *et al.* (2005) é necessária a utilização de 3 marcadores (SSU, ITS e β -tubulina) para avaliar o agrupamento de isolados do gênero *Thelebolus*. Bovio *et al.* (2018) utilizaram os marcadores ITS e β -tubulina para identificar novas espécies (*T. balaustiformis* e *T. spongiae*) isoladas de esponjas marinhas.

Houve apenas um representante do gênero *Trichoderma*. Fungos desse gênero são reconhecidos como celulolíticos e a presença da serragem pode ter induzido a seleção dele nas condições de cultivo aplicadas. São fungos cosmopolitas, recuperados eventualmente de amostras oriundas da Antártica (AZMI; SEPPELT, 1998; DUARTE *et al.*, 2018b; SAILI *et al.*, 2014; WENTZEL *et al.*, 2019). Isolados do gênero *Trichoderma* foram reportados na literatura como degradadores de diferentes tipos de poluentes ambientais, incluindo pesticidas e corantes têxteis, habilidade que pode ser atribuída a enzimas ligninolíticas expressas por fungos degradadores de biomassa vegetal (ADNAN *et al.*, 2015; ORTEGA *et al.*, 2011; SHANMUGAM *et al.*, 2017).

5.2. Temperatura ótima de crescimento

Dentre as temperaturas avaliadas, a temperatura ótima mais frequente foi a de 20 °C, tendo em vista que oito dos 20 isolados testados apresentaram melhor crescimento nesta

temperatura. Um total de quatro isolados cresceu melhor a 25 °C, outros cinco a 30 °C e dois a 15 °C (**Tabela 5**). O isolado J8D identificado como *Trichoderma* sp. cresceu em toda a área da placa e em todas as temperaturas estudadas. Os resultados indicaram que a temperatura foi um fator importante para o crescimento dos fungos isolados das amostras de sedimento marinho da Antártica (**Figura 6**).

Tabela 5: Caracterização da temperatura ótima de crescimento dos fungos estudados, considerando área de crescimento em 4 temperaturas (15, 20, 25 e 30 °C) após 7 dias em meio MA2. Ranqueamento da melhor temperatura realizado por meio de análise de variância e teste de Tukey ($p < 0,05$).

Isolado	Identificação	Melhor Temperatura	Observação
J2B	<i>Leuconeurospora</i> sp.	15 °C	Não crescem acima de 20 °C
J2C	<i>Leuconeurospora</i> sp.	15 °C	
J2F	<i>Geomyces/Pseudogymnoascus</i> sp.	20 °C	Não cresceram acima de 25 °C
D2B	<i>Thelebolus</i> sp.	20 °C	
D8A	<i>Geomyces/Pseudogymnoascus</i> sp.	20 °C	
D8B	<i>Thelebolus</i> sp.	20 °C	
J2D	<i>Geomyces/Pseudogymnoascus</i> sp.	20 °C	
J8A	<i>Geomyces/Pseudogymnoascus</i> sp.	20 °C	
D2A	<i>Geomyces/Pseudogymnoascus</i> sp.	20 °C	
D2D	<i>Geomyces/Pseudogymnoascus</i> sp.	20 °C	
J2E1	<i>Aspergillus</i> cf. <i>creber</i>	25 °C	
J2E2	<i>Aspergillus</i> cf. <i>creber</i>	25 °C	
J8B1	<i>Cosmospora/Pseudocosmospora</i>	25 °C	
J8B2	<i>Cosmospora/Pseudocosmospora</i>	25 °C	
D2C	<i>Penicillium</i> cf. <i>oxalicum</i>	30 °C	
D2P	<i>Penicillium</i> cf. <i>oxalicum</i>	30 °C	
D8C1	<i>Aspergillus</i> cf. <i>sydowii</i>	30 °C	
D8C2	<i>Aspergillus</i> cf. <i>sydowii</i>	30 °C	
J2A	<i>Penicillium</i> cf. <i>oxalicum</i>	30 °C	
J8D	<i>Trichoderma</i> sp.	ND	Cresceu em toda a placa em todas as temperaturas

ND = não determinada

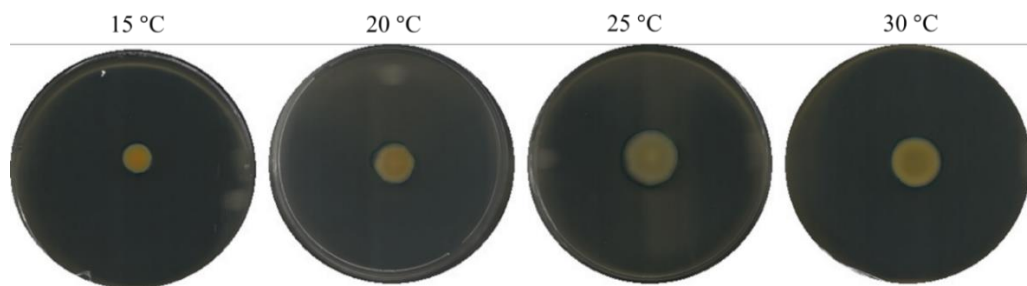


Figura 6: Figura demonstrativa da área de crescimento dos fungos. Crescimento do isolado J8B1 em meio MA2, incubados em quatro temperaturas diferentes por 7 dias. **Fonte:** A autora.

De acordo com os resultados obtidos, dois dos isolados (J2B e J2C) podem ser considerados como psicrófilicos, uma vez que não apresentaram crescimento acima de 20 °C (**Figura 7**). Esses isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Leuconeurospora*. Segundo Malloch *et al.* (2016), isolados desse gênero demonstraram crescimento em temperaturas entre 7 °C e 22 °C, enquanto Vaz *et al.* (2011) observaram o crescimento tanto a 4 °C quanto a 20 °C.

Um total de oito isolados (J2F, D2B, D8A, D8B, J2D, J8A D2D e D2A) apresentaram melhor temperatura de crescimento a 20 °C, sendo que quatro não apresentaram crescimento a 30 °C (J2F, D2B, D8A, D8B). Dois desses isolados (D2B e D8B) pertencem ao gênero *Thelebolus* e não cresceram acima de 25 °C (**Figura 8**). De acordo com Durán *et al.* (2019) fungos do gênero *Thelebolus* demonstraram crescimento a 15 °C e a 25 °C. Já foi observado o crescimento de indivíduos desse gênero em temperaturas de 2 °C, sendo induzido o dimorfismo em temperaturas a 22 °C (SAZANOVA *et al.*, 2019). Os outros seis isolados com melhor crescimento a 20 °C, são os identificados como *Geomyces/Pseudogymnoascus* sp. (J2F, D8A, J2D, J8A D2D e D2A). Em outros trabalhos reportados na literatura, como o de Azmi e Seppelt (1998), também foi verificado este mesmo espectro de temperatura ótima, onde os fungos antárticos avaliados apresentaram crescimento máximo no espectro de 15-25 °C, sendo 20 °C a melhor temperatura para a maioria dos isolados.

Considerando a origem dos micro-organismos avaliados, o fato da maioria apresentar crescimento em temperaturas abaixo de 20 °C evidencia a adaptação ao ambiente antártico. Martorell *et al.* (2019) demonstraram resultados similares quanto à avaliação de temperatura de crescimento de 51 fungos antárticos, onde 12 foram considerados psicrófilicos e 29 psicrotróficos, sendo a temperatura ótima entre 15 °C e 25 °C para a maioria dos isolados.

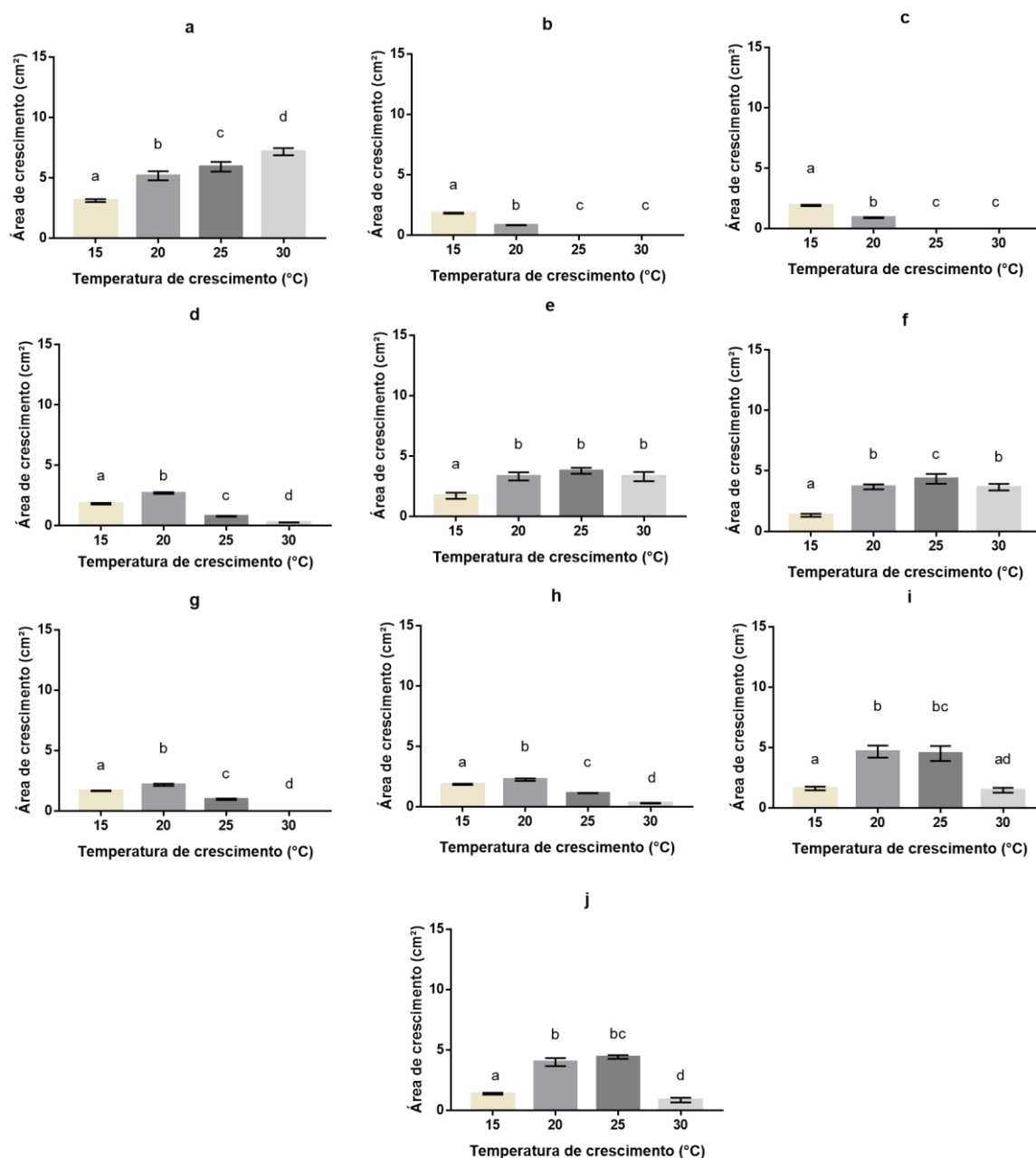


Figura 7: Crescimento (cm²) dos isolados fúngicos nas quatro temperaturas avaliadas (15, 20, 25 e 30 °C) após 7 dias incubação em MA2. (a) J2A; (b) J2B; (c) J2C; (d) J2D; (e) J2E1; (f) J2E2; (g) J2F; (h) J8A; (i) J8B1; (j) J8B2. *O isolado J8D não se encontra no gráfico por ter crescido em toda a placa em todas as temperaturas. Análise de variância (ANOVA) One-way, e teste de Tukey (p < 0,05). **Fonte:** a autora.

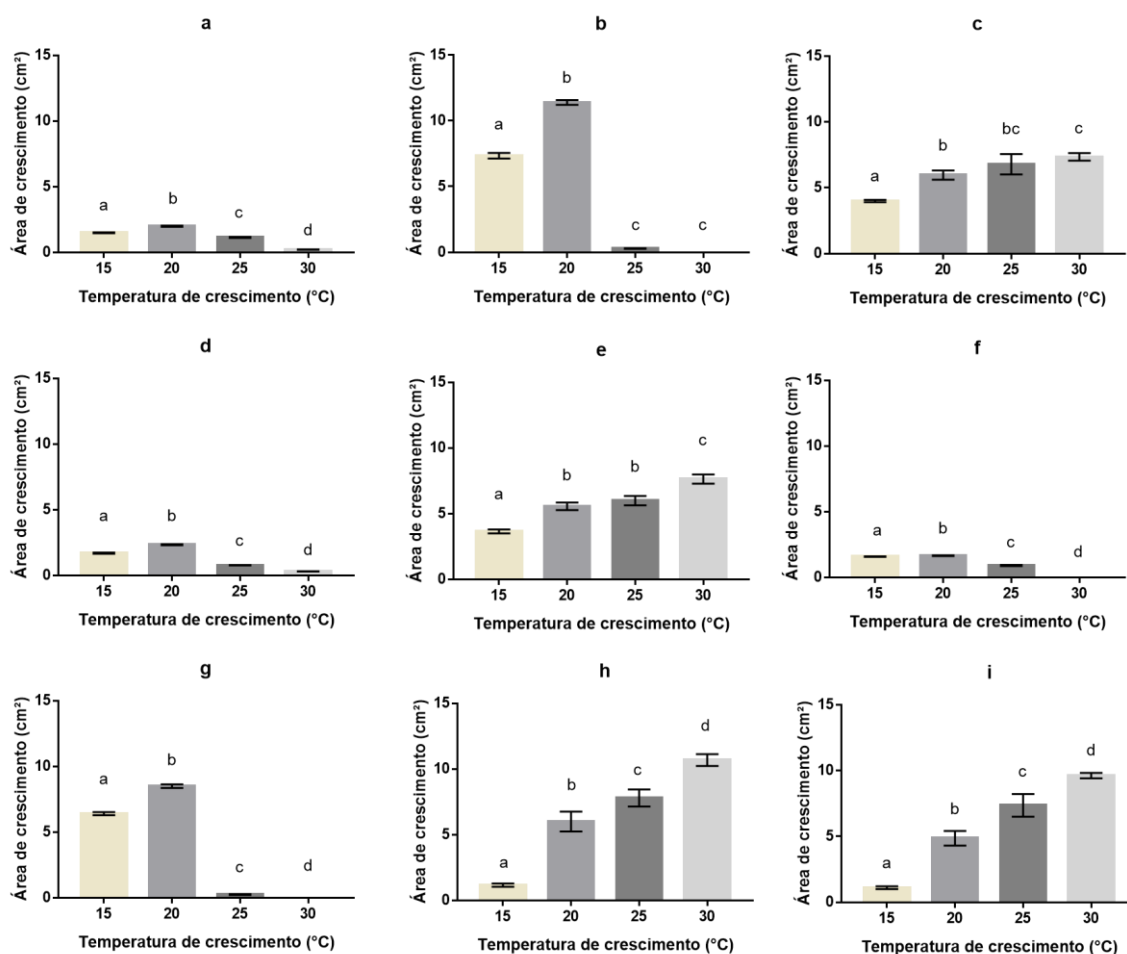


Figura 8: Crescimento (cm²) dos isolados fúngicos nas quatro temperaturas avaliadas (15, 20, 25 e 30 °C) após 7 dias de incubação em MA2. (a) D2A; (b) D2B; (c) D2C; (d) D2D; (e) D2P; (f) D8A; (g) D8B; (h) D8C1 e (i) D8C2. Análise de variância (ANOVA) One-way, e teste de Tukey ($p < 0,05$).
Fonte: a autora.

Um total de quatro isolados apresentou temperatura ótima em 25 °C (J2E1, J2E2, J8B1 e J8B2), dois são do gênero *Cosmospora/Pseudocosmospora* (J8B1 e J8B2). Esses gêneros são frequentemente observados em regiões tropicais, o que justifica a tolerância a temperaturas mais altas pelos isolados. No estudo de Durán et al. (2019), o melhor crescimento foi observado a 15 °C, sendo que temperaturas mais baixas resultaram no crescimento reduzido para isolados antárticos do gênero *Cosmospora/Pseudocosmospora* (Figura 7). Os outros dois isolados com temperatura ótima a 25 °C foram J2E1 e J2E2, identificados como *Aspergillus cf. creber*. Este gênero é cosmopolita e frequentemente recuperado na Antártica e, assim como os isolados J8B1 e J8B2, podem ter sido originados em áreas tropicais e desenvolvido tolerância a baixas temperaturas.

Cinco isolados apresentarem melhor crescimento a 30 °C (D2C, D2P, D8C1, D8C2 e J2A), dois deles foram identificados como *Aspergillus* cf. *sydowii* (D8C1 e D8C2) e três identificados como *Penicillium* cf. *oxalicum* (J2A, D2C e D2P). Fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* são encontrados tanto em regiões tropicais quanto em regiões polares. Conforme Cong *et al.* (2017), o fungo da espécie *A. sydowii* mostrou crescimento entre 3 °C e 37 °C, com temperatura ótima a 20 °C. Outros estudos reportaram dados similares de temperatura de crescimento para isolados antárticos do gênero *Penicillium*, entre 25 °C e 5 °C, sendo que nesta última o crescimento foi reduzido (BROADY; WEINSTEIN, 1998).

A adaptação de fungos a baixas temperaturas envolve principalmente mecanismos para manter a estabilidade da membrana, produção de enzimas antioxidantes, catalase e produção de crioprotetores, como o glicerol, manitol e trealose (RUISI *et al.*, 2007; SAZANOVA *et al.*, 2019; TSUJI, 2016).

Com base nas observações e nos resultados obtidos, 20 °C foi a temperatura definida para realização dos experimentos de antagonismo, descoloração e destoxificação do corante têxtil índigo carmine.

5.3. Antagonismo entre os isolados

Os resultados da avaliação de antagonismo entre os isolados estudados mostraram inibição pela maior parte deles. Os isolados D2A, D2B, D2D, D8B e J2D não inibiram nenhum outro fungo, porém eles foram inibidos por outros fungos. Um total de cinco isolados foram os que inibiram um maior número de fungos, sendo dois deles identificados como *Leuconeurospora* sp. (J2B e J2C) e três identificados como *Penicillium* cf. *oxalicum* (J2A, D2C e D2P) (**Tabela 6**).

A principal desvantagem apresentada pelo antagonismo é que isso limitou consideravelmente a possibilidade de combinações para estruturação de diferentes consórcios, considerando que os isolados que mais descolorem estão dentro dos que mais inibem.

Tabela 6. Matriz de interações entre isolados observadas após 14 dias de incubação em meio de cultivo MA2. Relacionar isolado da coluna com isolado da linha: **A>**: isolado inibiu; **< a**: isolado foi inibido por; **B**: inibição mútua; **C**: sobreposição sem inibição aparente.

	D2A	D2B	D2C	D2D	D2P	D8A	D8B	D8C	J2A	J2B	J2C	J2D	J2E	J2F	J8A	J8B	J8D
D2A				< a		< a	< a	< a	A >	A >	A >		A >	A >	A >	A >	C
D2B			A >		A >				A >	A >	A >			A >			C
D2C		< a			B	< a	< a	< a	B			< a	< a	< a	< a	< a	C
D2D	A >				A >				A >	A >	A >		A >	A >	A >		C
D2P		< a	B	< a		< a	< a	< a	B			< a	< a	< a	< a	A >	C
D8A	A >		A >		A >				A >	A >	A >						C
D8B	A >		A >		A >				A >	A >	A >			A >	A >		C
D8C	A >		A >		A >				A >	A >	A >			< a	< a		C
J2A	< a	< a	B	< a	B	< a	< a	< a				< a	< a				C
J2B	< a	< a		< a		< a	< a	< a				< a	< a			< a	C
J2C	< a	< a		< a		< a	< a	< a				< a	< a			< a	C
J2D			A >		A >				A >	A >	A >						C
J2E	< a		A >	< a	A >				A >	A >	A >						C
J2F	< a	< a	A >	< a	A >		< a	A >									C
J8A	< a		A >	< a	A >		< a	A >									C
J8B	< a		A >		A >					< a	< a						C
J8D	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	

O ambiente marinho antártico impõe diversos tipos de desafios e limitações, obrigando os organismos a competir pela sobrevivência. De acordo com Yogabaanu *et al.* (2017) fungos oriundos da Antártica pertencentes aos gêneros *Pseudogymnoascus* e *Penicillium* são capazes de inibir diferentes organismos patogênicos.

Novos compostos antimicrobianos estão entre as principais moléculas em bioprospecção nos últimos anos. Os fungos de origem marinha e ambientes extremos, como o Ártico e a Antártica, têm sido amplamente explorados por seus metabólitos secundários. A produção de um novo composto antibactericida por fungo do gênero *Pseudogymnoascus* foi reportado por Shi *et al.* (2021). Da mesma forma, Shah *et al.* (2020) e Li *et al.* (2018) observaram a produção de compostos bactericidas por fungos marinhos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*, respectivamente.

De acordo com Bovio *et al.* (2019) os micro-organismos marinhos têm sido responsáveis por cerca de 35% dos principais novos produtos com aplicação biomédica. Essa capacidade de produção de compostos pode ser responsável por conferir vantagem aos organismos nestes ambientes, que geralmente são altamente competitivos e oligotróficos.

5.4. Descoloração e destoxificação do corante têxtil índigo carmine pelos fungos marinhos

Dentre os 20 isolados avaliados, três apresentaram alta capacidade de descoloração do corante têxtil índigo carmine (acima de 60%) e três apresentaram capacidade moderada (acima de 30%) em meio de cultivo MA2. Os melhores resultados de descoloração foram obtidos com os isolados J2A (82%), D2C (76%) e D2P (60%), os quais foram identificados como *Penicillium cf. oxalicum*. Os isolados J2C (37%), J2E1 (30%) e J2E2 (42%), identificados como *Leuconurospora sp.* e *Aspergillus cf. creber*, respectivamente, apresentaram descoloração moderada (**Tabela 7**).

Os resultados de descoloração apresentados pelos isolados D2C e D2P já eram esperados, pois esses isolados haviam demonstrado potencial para descoloração do corante índigo sulfuroso em trabalho prévio do grupo. Além disso, outros trabalhos reportaram a descoloração e destoxificação de corantes por linhagens de *Penicillium oxalicum*, tanto por degradação enzimática (SAROJ *et al.*, 2014) quanto por adsorção (ZHANG *et al.*, 2003).

Um total de seis isolados (J2A, J2E1, J2E2, J8D, D2C e D2P) apresentou toxicidade maior do que a do respectivo controle (**Tabela 7**). Entre esses isolados estão os que apresentaram as maiores porcentagens de descoloração. Isso pode estar relacionado com o fato de que a degradação da molécula do corante em 7 dias de cultivo possa ter gerado subprodutos de degradação com maior toxicidade do que o próprio corante ou a produção de compostos tóxicos na presença do corante. O pH baixo pode ter sido um fator que contribuiu para a toxicidade, especialmente para os isolados J2A, D2C e D2P (FONTES *et al.*, 2021; RAMSAY; NGUYEN, 2002).

Por outro lado, os isolados J2F e J8A, identificados como *Geomyces/Pseudogymnoascus sp.*, apresentaram valores de toxicidade baixos, e o isolado D8C2 (*Aspergillus cf. sydowii*) apresentou destoxificação moderada, evidenciando o potencial para destoxificação do composto. A espécie *A. sydowii* já foi isolada de efluente têxtil e

demonstrou produção de enzimas associadas a degradação de corantes (e.g. lacase, celulase e lipase), sendo capaz de descolorir 74% o corante RBBR em 7 dias (BERNAL *et al.*, 2021).

Tabela 7. Caracterização do sobrenadante, pH médio, absorbância, descoloração, toxicidade e destoxificação do corante índigo carmine após cultivo de 7 dias em caldo MA2 + 0,1g/L de corante índigo carmine, 20 °C e 140 rpm. CTR1 – controle lote 1; CTR2 – controle lote 2; CTR 3 – controle lote 3.

Código isolado	Cor	pH médio	Absorbância média	% Descoloração.	% Toxicidade	% Destoxificação
CTR1	Verde claro	5,20	0,277 ± 0,00	---	77,3 ± 4,71	---
D2A	Verde claro	5,67	0,378 ± 0,06	0,0	62,5 ± 7,66	14,8 ± 6,26
D2D	Verde escuro	6,33	0,452 ± 0,02	0,0	65,5 ± 4,68	11,8 ± 3,83
J2A	Amarelado	3,23	0,048 ± 0,00	82,5 ± 2,75	90,0 ± 2,69	*12,6 ± 2,20
J2B	Verde claro	5,63	0,331 ± 0,02	0,0	70,4 ± 17,35	6,9 ± 14,17
J2C	Amarelado	4,83	0,172 ± 0,00	37,7 ± 2,05	71,0 ± 9,78	6,2 ± 7,98
J2D	Verde claro	4,63	0,261 ± 0,08	0,0	60,7 ± 4,33	16,6 ± 3,53
J2F	Verde escuro	6,70	0,780 ± 0,03	0,0	2,5 ± 7,99	74,7 ± 8,07
J8A	Verde escuro	5,77	0,578 ± 0,25	0,0	27,9 ± 22,73	49,3 ± 18,57
CTR2	Verde claro	5,20	0,321 ± 0,02	----	87,3 ± 2,30	----
D2C	Amarelo	2,30	0,074 ± 0,00	76,9 ± 3,59	100,0 ± 0,00	*12,7 ± 0,00
D2P	Amarelo	2,17	0,128 ± 0,01	60,0 ± 6,47	100,0 ± 0,00	*12,7 ± 0,00
D8A	Verde escuro	6,10	0,507 ± 0,04	0,0	68,4 ± 7,31	18,8 ± 5,98
D8C1	Amarelo	5,90	0,311 ± 0,03	0,0	78,3 ± 7,17	9,0 ± 5,86
D8C2	Verde Claro	6,20	0,482 ± 0,01	0,0	54,0 ± 6,94	33,2 ± 5,67
J2E1	Amarelo	5,77	0,224 ± 0,03	30,1 ± 12,53	90,6 ± 6,40	*3,3 ± 5,23
J2E2	Amarelo	5,50	0,185 ± 0,01	42,3 ± 5,79	94,2 ± 1,84	*6,8 ± 1,50
J8D	Verde escuro	7,10	0,376 ± 0,01	0,0	92,0 ± 3,42	*4,7 ± 2,79
CTR3	Amarelo	5,13	0,158 ± 0,02	----	88,9 ± 3,23	----
D2B	Amarelo	5,03	0,170 ± 0,07	0,0	72,1 ± 16,49	16,7 ± 13,46
D8B	Amarelo	6,17	0,232 ± 0,08	0,0	62,5 ± 22,71	26,4 ± 18,55
J8B1	Amarelo	5,13	0,260 ± 0,03	0,0	73,9 ± 16,16	15,0 ± 13,20
J8B2	Amarelo	5,37	0,436 ± 0,11	0,0	69,0 ± 11,77	19,8 ± 9,62

*: mais tóxico que o controle

Para os três isolados (J2F, J8A e D8C2) que apresentaram destoxificação, a descoloração não pôde ser quantificada, pois o ensaio apresentou absorbância maior do que a do controle o que pode indicar uma modificação na estrutura química do corante, ou produção de outros metabólitos secundários durante o metabolismo, o que, consequentemente, pode ter influenciado na toxicidade do sobrenadante.

O uso de fungos marinhos e extremófilos em estudos de degradação de corantes têxteis pode apresentar vantagens biológicas, tais como enzimas de baixa temperatura de ação (DUARTE *et al.*, 2018b; TSUJI *et al.*, 2013), tolerância a hidrocarbonetos (HUGHES; BRIDGE; CLARCK, 2007), tolerância a salinidade (KOCHKINA *et al.*, 2007) e tolerância a metais (FERNÁNDEZ *et al.*, 2017).

A degradação do índigo carmine por fungos já foi reportada na literatura. De acordo com Huy *et al.* (2020), o fungo *Fusarium oxysporum* HUIB02 foi capaz de descolorir 77% do corante em 6 dias. Cano *et al.* (2011) observaram 100% de descoloração de índigo carmine utilizando micélio liofilizado do basidiomiceto *Trametes versicolor* 8273. Bankole *et al.* (2017) observaram descoloração de 99% de corante índigo em 5 dias pela levedura *Diutina rugosa*.

O caldo/extrato enzimático produzido pelos fungos pode ser utilizado diretamente para a degradação do corante, a principal vantagem é a redução do tempo de descoloração (ZAPATA-CASTILLO *et al.*, 2015). No trabalho de Li *et al.* (2015b) foi demonstrado que o extrato enzimático do fungo *Phanerochaete chrysosporium* CICC 40719 é capaz de descolorir 90% de índigo carmine em 6 horas. Em adição, Lopes *et al.* (2020) observaram a capacidade do fungo *Pleurotus eryngii* PLE 05 em descolorir 100% de índigo carmine em 24 horas por meio de extrato enzimático.

Alguns dos estudos reportados na literatura com porcentagens maiores de descoloração e degradação utilizaram concentrações baixas do corante (10 a 60 mg/L). A concentração pode influenciar na degradação, como reportado por Bankole *et al.* (2017) que observaram uma diminuição na eficiência de degradação em concentrações acima de 60 mg/L. Da mesma forma Bernal *et al.* (2021) observaram menores taxas de descoloração para concentrações muito altas de corante 1.000 mg/L.

Quando se trata de descoloração de corantes, a maior parte dos estudos publicados na área utilizaram fungos basidiomicetos (fungos da podridão branca), uma vez que estes produzem enzimas ligninolíticas em grandes proporções. No presente trabalho, os principais isolados responsáveis pela descoloração e destoxificação são ascomicetos. Recentemente tem-

se observado o aumento de estudos de degradação de corantes e outros poluentes envolvendo ascomicetos, tanto com o uso de fungos, quanto de seus extratos enzimáticos. Em adição, tem-se observado também a produção ligninases por ascomicetos, incluindo fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Geomyces/Pseudogymnoascus* (BERNAL *et al.*, 2021; CONG *et al.*, 2017; DUARTE *et al.*, 2018b; WENTZEL *et al.*, 2019). De acordo com Singh e Singh (2017), o fungo *Aspergillus flavus* foi capaz de descolorir entre 60-70% de corantes ácidos e básicos num período de 10 dias. Similarmente Ashrafi *et al.* (2013) observaram descoloração de 13 corantes sintéticos de diferentes classes, mediado por lacase purificada do ascomiceto *Paraconiothyrium variable*. Condições de descoloração e destoxificação podem ser otimizadas com a alteração de parâmetros físico-químicos, como visto em Vieira *et al.* (2021), que utilizaram consórcios de fungos e bactérias associados a ambientes marinhos para descoloração do corante RBBR, otimizando o processo em condição salina.

Na condução dos experimentos de descoloração/destoxificação foi observada uma reação do corante com o meio MA2, contudo, não foi observada adsorção do corante pelos isolados estudados. Ademais, foi possível constatar a habilidade ou potencial de descoloração e destoxificação dos fungos antárticos e a partir disto foram selecionados os isolados utilizados para compor os consórcios.

5.5. Ensaios de degradação do corante têxtil índigo carmine pelos consórcios fúngicos

Para solucionar o problema de reação do corante com o meio de cultivo foi realizado um experimento utilizando meio Mínimo Mineral (MM1) acrescido de fonte de carbono (0,1% de extrato de malte, 0,1% de glicose). Os resultados demonstraram que após 7 dias o corante estava íntegro, sem alteração de cor. Além disso, foi realizado um teste para averiguar o crescimento dos fungos utilizando MM1+0,1% como fonte de carbono. Com base na biomassa observada, foi definido que o meio MM1 acrescido de 0,1% de glicose seria utilizado nos estudos de descoloração e destoxificação pelos consórcios fúngicos.

Os consórcios foram estruturados com base nos ensaios realizados anteriormente, visando estabelecer uma condição de estímulo ao co-metabolismo e ação sinérgica dos micro-organismos, aumentando a probabilidade de se obter a mineralização do corante (**Tabela 8**). Sendo assim, os isolados J2C, J2F e D8C2 foram escolhidos como base para os consórcios enquanto a variação foi o *Penicillium cf. oxalicum* (J2A, D2C e D2P). Foram considerados

principalmente os resultados de descoloração e destoxificação, assim como a taxonomia deles (*Leuconurospora* sp., *Geomyces/Pseudogymnoascus* sp. e *Aspergillus* cf. *sydowii*). Existem ainda outras combinações de consórcio e abordagens que podem ser exploradas com os fungos antárticos estudados.

Após os 7 dias de cultivo o ensaio foi filtrado, sendo o sobrenadante utilizado para análise de descoloração, destoxificação e pH. Nestas condições, foi observada visualmente a adsorção do corante pelos micélios fúngicos.

Tabela 8. Descrição dos consórcios estruturados para avaliação de descoloração, destoxificação, adsorção e produção de enzimas ligninolíticas. J2A (82% descoloração), D2C (76% descoloração) e D2P (60% descoloração), J2C (37% descoloração e 6% destoxificação), J2F (74% destoxificação) e D8C2 (33% destoxificação).

Consórcio 1	Consórcio 2	Consórcio 3
J2A	D2C	D2P
J2C	J2C	J2C
J2F	J2F	J2F
D8C2	D8C2	D8C2

5.5.1. Descoloração do corante índigo carmine pelos consórcios fúngicos

Com base nos resultados obtidos neste primeiro experimento, pode-se observar descoloração em todos os consórcios estruturados, a descoloração para os três consórcios testados, C1, C2 e C3, foi de 48%, 63% e 57%, respectivamente, havendo diferença estatística entre o C1 e C2 (**Figura 9**). Não houve uma mudança na cor do sobrenadante (azul para roxo/violeta) como reportado em alguns trabalhos. Foi observada uma diminuição da intensidade de azul, mais intensa ao início do ensaio e ao final do ensaio mais clara.

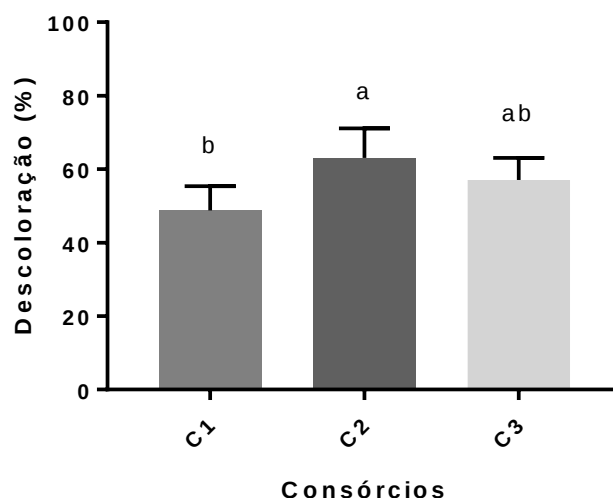


Figura 9. Descoloração do corante índigo carmine (100 mg/L) pelos três consórcios após cultivo em meio mínimo mineral 1 acrescido de 0,1% de glicose e 100 mg/L de corante índigo carmine após 7 dias a 20 °C e 140 rpm. Análise de variância (ANOVA) One-way, e teste de Tukey ($p < 0,05$). **Fonte:** a autora.

Os valores de descoloração anteriormente obtidos podem ter sido aumentados devido a reação inicial do corante com o extrato de malte, onde houve a modificação do grupo cromóforo (mudando de azul para verde, em alguns casos amarelado), indicado pela mudança de cor, evento que pode ter facilitado a degradação dos subprodutos resultantes pelos fungos. Além disso, a mudança do meio de cultivo pode ter influenciado o resultado, considerando que o meio malte é um meio complexo enquanto o meio mínimo mineral é um meio quimicamente definido e além de glicose não foi adicionado nenhuma outra fonte de carbono, nitrogênio e vitaminas que podem ser obtidas do extrato de malte.

De acordo com Mishra e Malik (2014) o consórcio composto pelos fungos *Aspergillus terreus*, *Aspergillus lentulus* e *Rhizopus oryzae* apresentou melhor performance de descoloração em comparação com os resultados obtidos com os fungos individualmente. O consórcio estudado por Shakeel *et al.* (2020), constituído por uma bactéria (*Shewanella* sp. NIAB-BM15) e um fungo (*Aspergillus terreus* NIAB-FM10) descoloriu o corante vermelho S3B em 4 horas.

No presente trabalho foi observada a formação de *pellets* miceliais pelos fungos do consórcio. Essas estruturas são uma forma otimizada do fungo filamentoso se desenvolver, quando em meio líquido sob agitação, melhorando a dispersão de oxigênio e nutrientes (LI *et al.*, 2020). De acordo com Tang *et al.* (2019) nos experimentos com o consórcio constituído

pelo fungo *Aspergillus* sp. XJ-2 e pela microalga *Chlorella sorokiniana* XJK também houve a formação de *pellets* miceliais e descoloração do corante vermelho disperso 3B.

Dois dos fungos componentes dos consórcios estudados são dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e estão entre os isolados que apresentaram bons resultados de descoloração e destoxificação. Outros estudos envolvendo estes gêneros evidenciaram a capacidade dos mesmos para descoloração de corantes quando em consórcios, como é o caso de Saroj *et al.* (2015) que reportaram a completa descoloração dos corantes vermelho ácido 183 e vermelho direto 75 em concentrações entre 200 e 400 mg/L pelo consórcio composto por *P. oxalicum*, *A. niger* e *A. flavus*.

5.5.2. Fitotoxicidade do corante índigo carmine após tratamento com os consórcios fúngicos

Os resultados de toxicidade após 7 dias de cultivo (**Figura 10**) foram maiores nos tratamentos com os consórcios (100% de inibição das sementes em todos) do que no experimento controle (50% de toxicidade). O aumento da toxicidade pode ser resultante da degradação do corante em subprodutos mais tóxicos, que pode variar conforme o método de degradação e/ou complexo enzimático usado na degradação do composto (RAMSAY; NGUYEN, 2002; FONTES *et al.*, 2021).

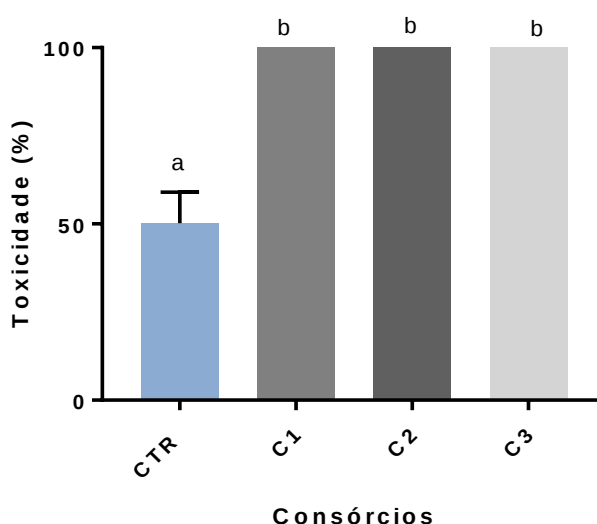


Figura 10. Fitotoxicidade utilizando *C. sativus* como bioindicador apresentada pelos consórcios cultivados em meio mínimo mineral 1, acrescido de 0,1% de glicose e 100 mg/L de corante índigo carmine após 7 dias a 20 °C e 140 rpm. Análise de variância (ANOVA) one-way, e teste de Tukey ($p < 0,05$). **Fonte:** a autora.

As condições de cultivo dos consórcios podem ser otimizadas focando na diminuição da toxicidade. A adição de surfactantes ou maior período de incubação podem ser diferenciais para otimização destes processos. O processo de otimização utilizado por Vieira *et al.*, (2021) foi eficiente em melhorar os resultados de destoxificação e descoloração.

5.5.3. Avaliação da presença de enzimas ligninolíticas

As enzimas ligninolíticas avaliadas não foram detectadas nos caldos de cultivo (sobrenadantes) dos tratamentos com os consórcios nas condições estudadas. Considerando que os isolados têm origem marinha e Antártica, as condições de análise (e.g. tempo de incubação, condições de detecção) podem não ter sido as ideais para a detecção das enzimas. De acordo com Cong *et al.* (2017) a linhagem *A. sydowii* MS-19 isolada de amostra da Antártica produziu ligninases com atividade enzimática entre 0 °C e 30 °C. Da mesma forma Asadi, Makhdoumi e Asoodeh (2020) reportaram que a lacase produzida pela bactéria marinha estudada teve atividade ótima a 20 °C, em contraste com a temperatura reportada como ótima para medição da atividade de lacase, que é de 37 °C. Os autores atribuíram as peculiaridades da enzima ao habitat original da bactéria (Mar Cáspio).

A produção dessas enzimas pode ser estimulada por meio da adição de indutores (e.g. biomassa vegetal, ABTS e siringaldazina). Huy *et al.* (2020) observaram o aumento de 5 vezes na produção de enzimas ligninolíticas por *Fusarium oxysporum* HUIB02 utilizando biomassa vegetal. Assim como Zapata-Castillo *et al.* (2015) observaram a descoloração de 100% de índigo carmine com a adição de siringaldeído como mediador de lacases.

Os resultados negativos para a produção de enzimas ligninolíticas, associados a baixa adsorção do corante pelos micélios fúngicos, indicam que a descoloração do índigo carmine observada nos tratamentos ocorreu por outras vias metabólicas não avaliadas neste estudo. Assim, a descoloração pode estar ocorrendo intracelularmente ou sendo mediada por outras enzimas extracelulares, sendo necessários experimentos adicionais para averiguar estas hipóteses.

Enzimas não ligninolíticas atuam no processo de degradação de poluentes ambientais. Um exemplo é o sistema citocromo P450 (CYP450), que compreende uma variedade de heme-monooxigenases que realizam reações como: catálise oxidativa, epoxidação, desaminações e dealquilações (DESHMUKH; KHARDENAVIS; PUROHIT, 2016; GIOVANELLA *et al.*,

2020; HUSSAIN *et al.*, 2020). Essas enzimas são encontradas em praticamente todos os organismos, sendo que nos fungos são extremamente diversas, agrupadas em centenas de famílias (COOK *et al.*, 2016; NELSON, 2018). Wang *et al.* (2019) demonstraram a degradação de inseticida neonicotinoide pelo basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* ME-446 intermediada pelo CYP450. No trabalho de Vieira *et al.* (2018) foi observada a degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos pelo fungo marinho *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 mediada pelo CYP450. Vasconcelos *et al.* (2019) detectaram por análise do transcriptoma diversos genes expressos durante a degradação do pireno, dentre eles genes que codificam para CYP450 monooxigenases.

Outro grupo de enzimas atuantes na degradação de poluentes ambientais são as azoredutases e as epóxi-hidrolases, as quais podem complementar a degradação, metabolizando compostos intermediários gerados pela ação do CYP450 (SCHWARZ *et al.*, 2019; ZAFRA; CORTÉS-ESPINOSA, 2015). No estudo de Park *et al.* (2019) o fungo *Dentipellis* sp. KUC8613 foi analisado geneticamente, sendo encontrados 154 genes que codificam enzimas do sistema CYP450, 11 genes para enzimas ligninolíticas, 19 epoxi-hidrolases, 16 álcool desidrogenases, 17 aldeído desidrogenases, entre outras. Estudos como este demonstram a complexidade requerida para degradação de compostos recalcitrantes, não se restringindo somente a um grupo enzimático.

5.5.4. Adsorção do corante índigo carmine pelos micélios inativados

Os resultados apresentados na **Figura 11** indicam baixa adsorção do corante pelos micélios fúngicos. Para os consórcios 1, 2 e 3 foi observado 2,0 %, 3,4 % e 1,9 % de adsorção respectivamente e não houve diferença estatística entre os tratamentos.

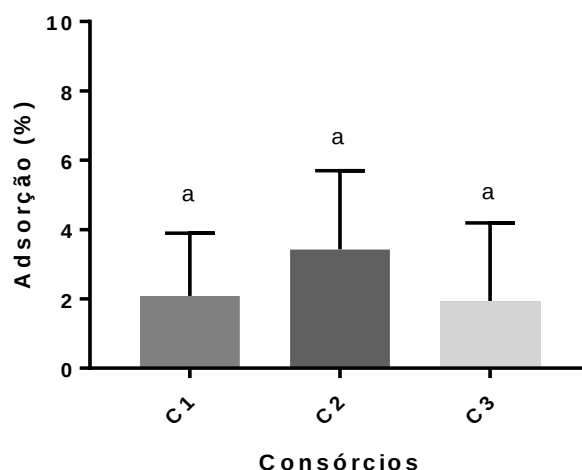


Figura 11. Adsorção do corante pelo micélio inativado dos diferentes consórcios após cultivo em meio mínimo mineral 1 acrescido de 0,1% de glicose e corante índigo carmine (100 mg/L) por 7 dias a 20 °C e 140 rpm. Análise de variância (ANOVA) one-way, e teste de Tukey ($p < 0,05$). **Fonte:** a autora.

A adsorção é reportada como uma das principais formas de remoção de poluentes, sendo um método simples e com bom custo-benefício. De acordo com Hamad e Saied (2021), o fungo *Aspergillus niger* MK640786 removeu 98% de vermelho congo por adsorção. Zhang *et al.* (2003) usaram *pellets* miceliais de *Penicillium oxalicum* GCMCC 0810 para a adsorção de corantes reativos, os *pellets* removeram 90% do corante por adsorção. Com o uso de fungos vivos, pode-se observar tanto a adsorção pelo micélio quanto a degradação enzimática. De acordo com Li *et al.* (2020) *pellets* de fungos do gênero *Penicillium* foram capazes de descolorir corantes em meios com deficiência nutricional e *pellets* de fungos do gênero *Aspergillus* foram capazes de adsorver o corante e simultaneamente degradar em condição salina e ácida.

A biomassa produzida durante a etapa do pré-inóculo para este teste em meio MM1 + 0,1% de glicose, foi menor (não quantificada) quando comparada aos ensaios realizados anteriormente em MA2. A quantificação da biomassa seca é uma boa opção para confirmar esta observação.

Considerando os resultados de toxicidade, descoloração e adsorção (**Tabela 9**), o consórcio 2 foi selecionado e submetido a novos experimentos com adição de fungos basidiomicetos de origem Antártica (*Pholiota* sp. CRM 2306) e de origem marinha da costa brasileira (*Peniophora* sp. CBMAI 1063).

Tabela 9: pH médio, descoloração, destoxificação e adsorção dos consórcios selecionados após cultivo em meio MM1 + 0,1% de glicose + 0,1 g/L de índigo carmine por 7 dias a 20 °C e 140 rpm.

Consórcio	pH médio	% Toxicidade	% Descoloração	% Adsorção
CTR	6,90 ± 0,01	55,2 ± 8.80	-	-
C1	6,44 ± 0,03	100,0 ± 0,00	48,7 ± 6,50	2,0 ± 1,80
C2	6,46 ± 0,03	100,0 ± 0,00	63,0 ± 8,00	3,4 ± 2,20
C3	6,54 ± 0,02	100,0 ± 0,00	57,0 ± 5,90	1,9 ± 2,20

5.6. Ensaios dos consórcios acrescidos dos basidiomicetos *Peniophora* sp. CBMAI 1063 e *Pholiota* sp. CRM 2306

5.6.1. Descoloração do corante índigo carmine pelos consórcios com inclusão dos basidiomicetos

Os novos consórcios descoloriram entre 40-50% do corante índigo carmine. Comparados ao ensaio anterior, a descoloração do C2 foi menor, contudo, anteriormente a separação do sobrenadante era realizada por meio de filtração, o que retinha parte do corante. Neste ensaio, a separação foi realizada por meio de centrifugação, o que permitiu observar os valores mais reais de descoloração (**Figura 12**).

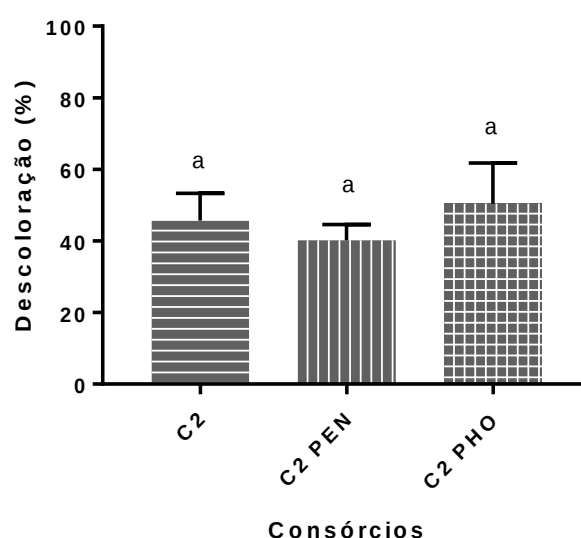


Figura 12. Análise de descoloração dos três consórcios estudados após cultivo em meio mínimo mineral 1, acrescido de 0,1% de glicose e 100 mg/L de corante índigo carmine por 7 dias a 20 °C e 140 rpm. Análise de variância (ANOVA) one-way, e teste de Tukey ($p < 0,05$). **Fonte:** a autora.

Basidiomicetos são amplamente aplicados na degradação de corantes têxteis e outros hidrocarbonetos poluentes. Estudos especificamente para descoloração do índigo carmine já foram realizados utilizando diferentes espécies, incluindo *Phanerochaete chrysosporium*, *Heterobasidion insulare*, *Ganoderma weberianum*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Trametes versicolor* e *Pleurotus ostreatus* (CANO *et al.*, 2011; LI-HONG *et al.*, 2016; KAHRAMAN *et al.*, 2012; PODGORNIK; POLJANSEK; PERDIH, 2001; TIAN *et al.*, 2013; YAVUZ; KAYA; AYTEKIN, 2014; ZHANG *et al.*, 2016).

Os fungos basidiomicetos da podridão branca tem alta produção de enzimas ligninolíticas podendo alcançar valores entre 80 e 100% de descoloração em tempos reduzidos. Ambos os basidiomicetos acrescentados são pertencentes ao grupo dos fungos da podridão branca. Não houve uma diferença significativa entre os tratamentos com esses fungos. O tempo de inoculação pode ter influenciado o resultado, considerando que os fungos ascomicetos foram incubados 48 horas antes dos basidiomicetos serem introduzidos, sendo possível ter ocorrido o esgotamento das fontes de carbono. Além disso, pode ter ocorrido a inibição entre os fungos do consórcio e os basidiomicetos. A análise de antagonismo e o cultivo dos basídiomicetos individualmente serão necessários para entender melhor o processo.

O fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (C2 PEN) já foi reportado como bom degradador de corante preto reativo 5 (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2016), onde foi alcançado 94% de descoloração em 7 dias. Entretanto, estes resultados foram obtidos numa condição otimizada, um dos fatores de otimização era a salinidade, condição ausente no presente estudo. Sabe-se ainda que este fungo é altamente produtor de lacases (BRENELLI *et al.*, 2019; MAINARDI *et al.*, 2017; OTERO *et al.*, 2017) e outras enzimas ligninolíticas (BONUGLI-SANTOS, DURRANT e SETTE, 2012) o que indica que as condições do ensaio podem não ter sido as mais favoráveis para o fungo. Um outro fator a ser considerado é a temperatura utilizada. Apesar de crescer a 20 °C, todos os demais trabalhos que utilizaram o *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em bioensaios de degradação de corantes e/ou produção de enzimas a temperatura foi de 28 °C. Além da temperatura, deve-se considerar o tempo de incubação. Os basidiomicetos foram incubados por 5 dias nos consórcios.

O fungo *Pholiota* sp. CRM 2306 foi isolado de solo de recuo de geleira na Antártica, em estudos prévios do grupo, apresentou descoloração e destoxificação do corante vermelho do congo, produção de enzimas ligninolíticas e temperatura ótima de crescimento de 20 °C (dados não publicados), a mesma temperatura das condições de cultivo do presente trabalho.

O consórcio com o *Pholiota* sp. CRM 2306 (C2 PHO) foi o que apresentou a maior porcentagem de descoloração, podendo esta ter ocorrido tanto por degradação enzimática quanto por adsorção. De acordo com Kiiskinen, Rättö e Kruus (2004) espécies desse gênero produziram enzimas ligninolíticas para degradação de corantes e outros poluentes. Indivíduos do gênero *Pholiota* estavam entre os principais degradadores de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no estudo de Steffe, Hatakka e Hofrichter (2002), sendo a degradação mediada principalmente por manganês peroxidase.

A verificação da presença de enzimas ligninolíticas não foi realizada nestes experimentos devido à quantidade de sobrenadante disponível para a execução dos ensaios.

5.6.2. Toxicidade do corante índigo carmine após tratamento com os consórcios acrescidos dos basidiomicetos

Nesses ensaios de fitotoxicidade foram realizadas alterações (diluição do sobrenadante 1:1 e filtração em membrana de 0,22 μ m), uma vez que esporos do sobrenadante se desenvolveram na semente de *C. sativus* e inibiram a germinação, o que pode ter causado a alta toxicidade no ensaio anterior. Assim, foram necessárias adaptações ao método para verificar a toxicidade real do sobrenadante.

O C2 sem basidiomiceto apresentou a maior toxicidade entre todos os tratamentos (61,7%). O C2 PHO apresentou 43,2% de toxicidade, próximo a toxicidade apresentada pelo controle (40,4%) e o C2 PEN apresentou toxicidade um pouco mais baixa do que a do controle (32,1%) (**Figura 13**).

A menor toxicidade nos tratamentos C2 PEN e C2 PHO quando comparadas ao C2, podem ser resultantes da ação dos basidiomicetos. Estes fungos, como já citado anteriormente, tem um repertório de enzimas que podem ter sido expressas durante o período de incubação. Além do corante, meio MM1 e 0,1% de glicose, nenhum outro componente foi adicionado. A presença do basidiomiceto no consórcio introduz uma variação metabólica que pode ter degradado o corante e resultado na toxicidade mais baixa dos tratamentos.

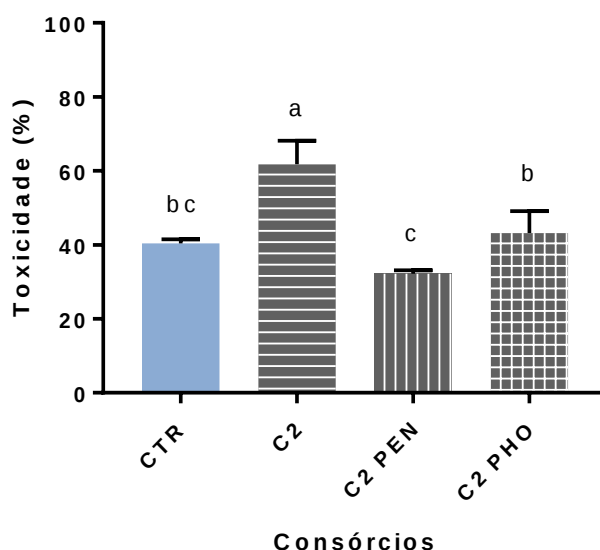


Figura 13: Análise de fitotoxicidade dos tratamentos com os três consórcios estudados após cultivo em meio mínimo mineral 1, acrescido de 0,1% de glicose e 100 mg/L de corante índigo carmine por 7 dias a 20 °C e 140 rpm. Análise de variância (ANOVA) one-way, e teste de Tukey ($p < 0.10$). **Fonte:** a autora.

Apesar de ter apresentado uma toxicidade menor entre os tratamentos, a toxicidade dos dois consórcios com basidiomicetos não foi estatisticamente diferente a do controle. O consórcio C2 PEN apresentou a menor toxicidade dentre os tratamentos estudados (**Figura 13**). A toxicidade nem sempre tem relação com a descoloração. Fontes *et al.* (2021) observaram aumento da toxicidade aguda nos tratamentos de corante têxtil com enzimas do *Peniophora* sp. CBMAI 1063.

5.6.3. Biomassa seca dos consórcios

O consórcio desenvolvido sem a presença do corante acumulou menos biomassa (C2-SC - 0,069 g) em relação aos bioensaios contendo o corante, sendo a maior biomassa o tratamento com o C2 PHO (0,122 g), seguido do C2 PEN (0,111 g) e C2 (0,108 g) (**Figura 14**). A diferença de biomassa na presença e ausência do índigo carmine foi estatisticamente significativa. Porém, considerando somente os tratamentos com a presença do corante, não houve diferença estatística. Isto pode indicar que os basidiomicetos provavelmente não desenvolveram muita massa micelial no tempo de incubação, considerando que eles foram inoculados em formato diferente e que ficaram apenas 5 dias incubados em consórcio. O

desenvolvimento de maior quantidade de biomassa na presença do índigo carmine pode indicar a assimilação do corante como fonte de carbono.

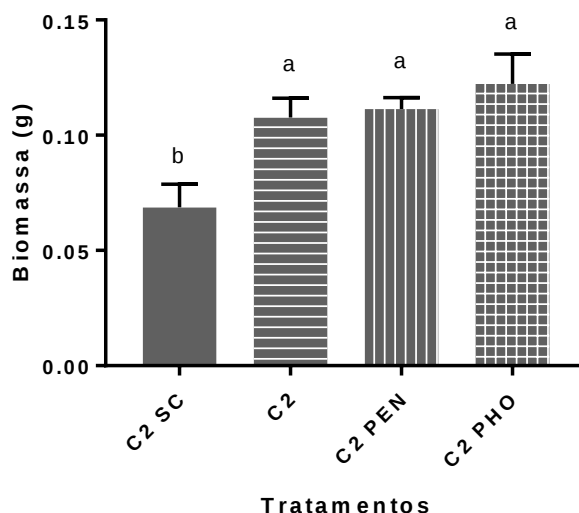


Figura 14. Análise de biomassa realizada por meio de peso seco. Cultivo do micélio realizado em MM1 + 0,1% glicose/L com e sem corante (100 mg/L), incubados a 20°C por 7 dias sob agitação de 140 rpm. Análise de variância (ANOVA) one-way, com pós teste Tukey ($p < 0,05$).

Diferente destes resultados, Vieira *et al.* (2021) observaram que tanto na presença quanto na ausência do corante RBBR, não houve diferença na biomassa dos consórcios estudados. O acúmulo de biomassa não teve influência na produção de enzimas ligninolíticas no estudo de Levin, Melignani e Ramos (2010), sendo reportado pelos autores que cofatores como fontes de nitrogênio e vitaminas tiveram correlação com a maior produção destas enzimas.

As condições de cultivo podem ter diferentes efeitos no comportamento e metabolismo microbiano. Assim, podemos considerar os resultados do presente trabalho promissores, uma vez que não foram ainda realizados estudos de avaliação de diferentes variáveis visando otimização da descoloração e destoxificação do corante índigo carmine. Em adição, análises complementares serão necessárias para averiguar a relação da biomassa com a atividade metabólica dos consórcios, bem como a cinética de adsorção e degradação do corante.

5.6.4. Metabólitos de degradação GC-MS

Os cromatogramas dos tratamentos contendo os consórcios acrescidos dos basidiomicetos (C2 PEN e C2 PHO), do consórcio 2 sem os basidiomicetos (C2) e do controle (CRT) estão apresentados na **Figura 15**. Foi constatada a presença de picos que representam compostos do tipo amida, hidrocarbonetos simples, ácidos graxos, aldeídos e álcoois.

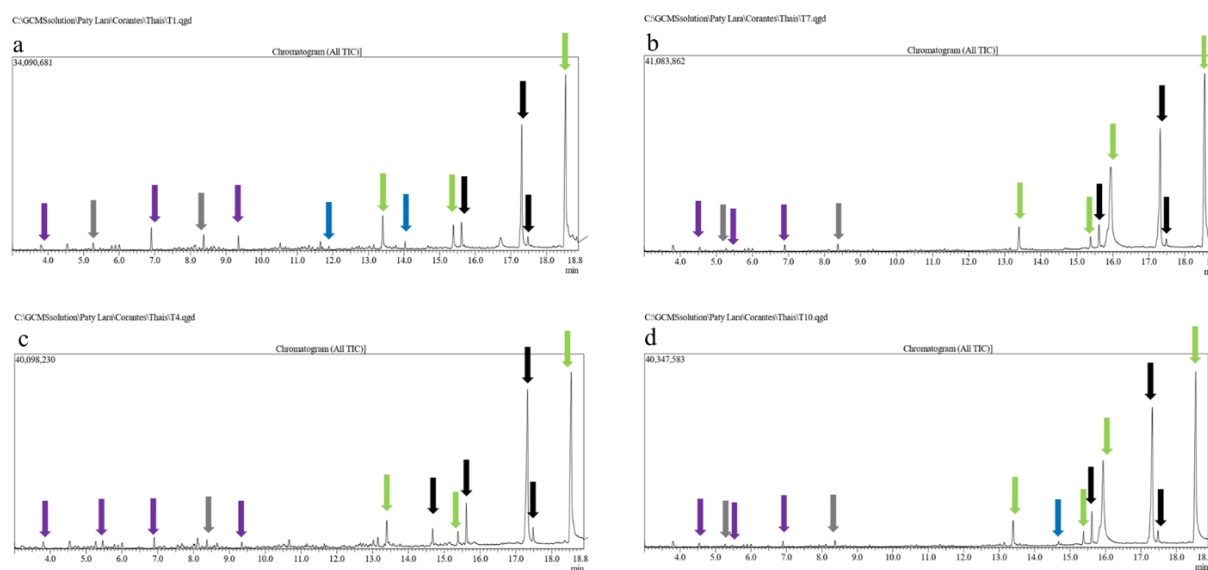


Figura 15. Cromatogramas dos ensaios (a) Controle, (b) C2PEN, (c) C2 e (d) C2PHO. Setas roxas representam compostos hidrocarbonetos; setas cinzas compostos benzeno e fenol; setas azuis compostos aldeídos; setas verdes compostos ácidos graxos; setas pretas compostos nitrogenados. **Fonte:** a autora.

Hidrocarbonetos simples como o tetradecano foram observados em todos os cromatogramas, o hexadecano nos tratamentos CTR e C2 e o benzeno nos CTR, C2 PEN e C2 PHO. Hidrocarbonetos simples diminuíram em relação ao controle, sendo que entre os tratamentos C2 PEN e C2 PHO a redução desses picos foi similar, enquanto no C2 foi a menor entre os três.

Ácidos graxos na forma de ácido hexadecanoico apareceram em dois picos em todos os tratamentos, o primeiro no tempo de retenção (TR) 13,405 min e o segundo em 18,537 min. Picos de ácido octadecanoico foram observados em todos os tratamentos aos 15,386 min. Entretanto, os tratamentos C2 PEN e C2 PHO apresentaram um segundo pico aos 15,931 min. O ácido hexadecanoico dos 18,548 min aumentou consideravelmente para C2 PEN, C2 PHO e C2, porém para os demais ácidos graxos não houve alteração aparente nos picos.

Aldeídos simples foram observados no CTR na forma de tetradecanal e octadecenal, aos 11,835 e 14,029 min, respectivamente. No tratamento com o C2 PHO esses compostos apareceram como cis-9-hexadecenal aos 14,667 min. No geral, os aldeídos nos tratamentos diminuíram consideravelmente.

Compostos nitrogenados foram observados em todos os tratamentos. Contudo, no extrato do C2 houve um pico que não apareceu nos demais cromatogramas, com TR 14,680 min, correspondendo ao composto oleanitrila (85% similaridade).

Outros picos com compostos nitrogenados foram detectados, sendo o tempo de retenção similar em todos os cromatogramas (CTR, C2, C2 PEN e C2 PHO). O pico aos 15,615 min correspondeu ao composto hexadecanamida (94% similaridade) para os tratamentos CTR, C2 e C2 PHO e octadecanamida (93% similaridade) para o tratamento C2 PEN.

O pico aos 17,320 min em todos os tratamentos correspondeu ao composto 9-octadecanamida (91% similaridade). Enquanto o último pico, aos 17,480 min, correspondeu ao composto octadecanamida (entre 86% e 89% similaridade) para os tratamentos CTR, C2 e C2 PHO e tetradecanamida (86 % similaridade) para o tratamento C2 PEN (**Figura 15**).

Todos os compostos nitrogenados aumentaram nos tratamentos, estes compostos fazem parte do grupo de aminas/amidas graxas (*fatty nitrile/amides*) tendo como precursores ácidos graxos (**Figura 16**).

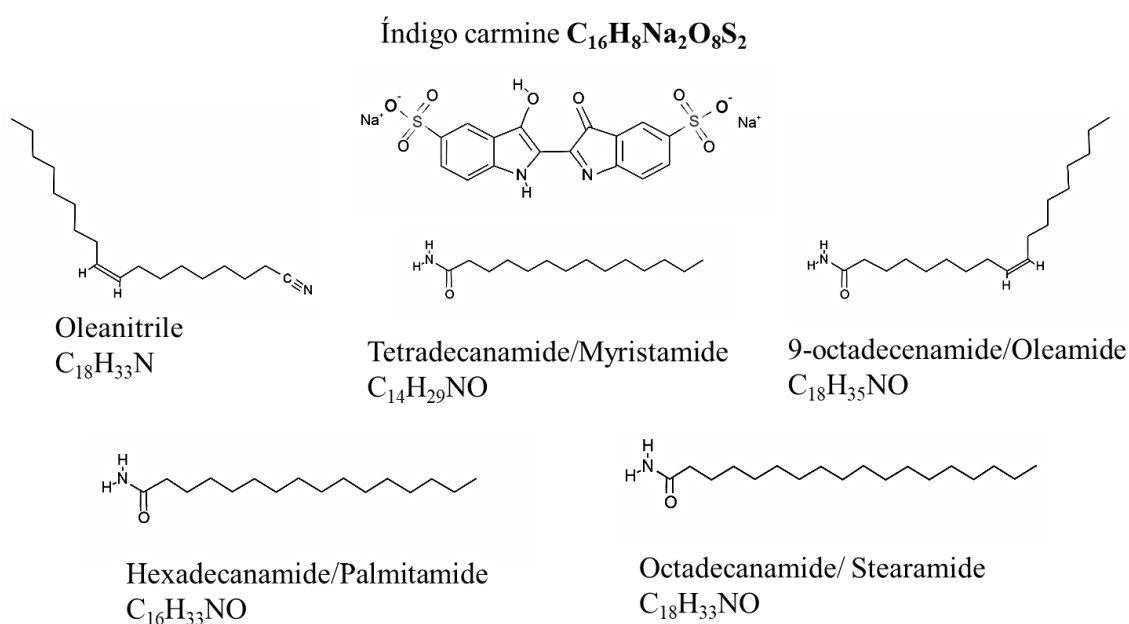


Figura 16: Metabólitos nitrogenados que foram detectados na análise de GC-MS e estrutura do índigo carmine. **Fonte:** a autora.

Metabolicamente, estes compostos nitrogenados podem ser hidrolisados em NH_4 e o ácido carboxílico correspondente pela enzima amida graxa hidrolase (FAAH – *fatty acid amide hydrolase*). Essa enzima catalisa ligações de carbono-nitrogênio, podendo atuar em diferentes amidas graxas independentemente do tamanho e número de insaturações, bem como compostos ésteres e nitrilas (BOGER *et al.*, 2000; MIN *et al.*, 2019). Essa enzima já foi identificada em *Candida albicans* e outras leveduras, é uma enzima bem distribuída nos organismos, o que sugere a presença em ancestrais antes da divisão procariota e eucariota. Entretanto, a comparação realizada por Min *et al.* (2019) mostra a separação de FAAH fúngicas em um grupo monofilético. Aziz e Chapman (2020) teorizam que esta família enzimática está envolvida na comunicação entre plantas e fungos simbioses/endofíticos, mediados por meio de alcamidas (grupo de amidas graxas) presentes nos dois grupos. Nas condições testadas, estes compostos nitrogenados detectados (**Figura 16**) não puderam ser associados diretamente a degradação do índigo carmine, uma vez que são subprodutos comuns do metabolismo podendo ser originados em diferentes vias metabólicas.

O benzeno e ácidos carboxílicos podem ser encontrados ao final de degradação oxidativa química ou biológica do índigo carmine (CHOWDHURY *et al.*, 2020), entretanto, sem a presença de outros metabólitos intermediários não se pode afirmar se eles são oriundos da degradação do índigo carmine.

Resultados similares foram obtidos por Rajendran *et al.* (2015), onde produtos mais simples como o octadecano foram detectados nas análises de GC-MS após degradação de efluente têxtil (indústria de jeans) por bactérias.

Compostos comumente detectados como metabólitos de degradação do índigo carmine são sulfonados, resultantes da quebra simétrica da molécula de corante, os quais são reportados como subprodutos em diferentes métodos de degradação. Flox *et al.* (2006), utilizando métodos foto-oxidativos, observaram a formação de insatina em GC-MS (TR 12,8 min) e em LC-MS (TR 10,7). Li *et al.* (2015b) observaram por meio de GC-MS a formação de insatina (TR 14,95) como metabólito de degradação de índigo carmine mediado por enzimas de *Phanerochaete chrysosporium*. Além da insatina, já foram observadas a insatina-5-ácido sulfônico bem como

a forma indoline ácido sulfônico, estes compostos sulfonados podem ser resultantes da oxidação ou redução da ligação C=C (FLOX *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2015a).

Apesar de não terem sido detectados compostos reportados como intermediários da degradação do corante índigo carmine no presente trabalho, os resultados das análises de GC-MS revelaram diferenças metabólicas nos bioensaios, em especial para o C2 que apresentou uma amina graxa a mais (oleanitrila) em relação aos tratamentos C2 PHO e C2 PEN. Em adição, o C2 PEN apesar de ter apresentado aminas graxas nos mesmos TR, foram compostos com cadeias de tamanhos diferentes dos ensaios C2 e C2 PHO. A não detecção de compostos intermediários pode ter ocorrido devido ao método de extração e analítico utilizados, que podem não ter sido favorável para os metabólitos de interesse. Seja no processo de extração no tempo correto de incubação onde os metabólitos poderiam ter sido detectados, nas condições de detecção do equipamento, ou ainda pela baixa concentração dos metabólitos. Novos métodos, solventes e condições de análises devem ser testados para ampliar o espectro de detecção destes compostos intermediários e assim elaborar a rota metabólica de degradação do corante.

6. CONCLUSÕES

A metodologia aplicada para a caracterização taxonômica dos 20 fungos utilizados no presente trabalho, os quais foram recuperados a partir de amostras de sedimentos marinhos da Antártica, permitiu a identificação de 12 isolados no nível de gênero, sendo que para 7 deles a possível espécie foi indicada. Para os outros 8 isolados, a caracterização taxonômica permitiu a indicação de dois possíveis gêneros. Todos os fungos foram classificados como pertencentes ao grupo dos ascomicetos.

A avaliação da temperatura ótima de crescimento, revelou a adaptação dos isolados ao ambiente antártico, sendo dois deles classificados como psicrófilos e 12 como psicrotolerantes.

Resultados de descoloração e destoxificação acima de 30% foram obtidos para 20% e 10% dos isolados estudados, respectivamente. Quando combinados em consórcios, esses isolados demonstraram habilidade para tolerar e descolorir o corante têxtil índigo carmine a 20 °C.

A adição dos fungos basidiomicetos de origem Antártica e de origem marinha da costa brasileira aos consórcios ampliou o desempenho de descoloração e destoxificação do índigo carmine, se comparado ao desempenho do consórcio contendo apenas os fungos ascomicetos. Os dados derivados das análises dos metabólitos gerados durante a descoloração e destoxificação do índigo carmine não puderam ser relacionados com a degradação do corante.

Os resultados do presente trabalho evidenciam o potencial de fungos recuperados (seletivamente) a partir de amostras marinhas da Antártica para descolorir e destoxificar o corante índigo carmine em temperatura baixa/moderada, abrindo novas perspectivas para estudos de fungos extremófilos aplicados a biorremediação de poluentes ambientais. Em adição, esses resultados agregam valor à coleção de fungos da Antártica do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial (LAMAI), a qual está associada à Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI, B. Removal of Dye by Biological Methods Using Fungi. **International Journal of Medical Reviews**, v. 4, n. 4, p. 112–118, 2017.
- ABRAMOFF, M D; MAGALHÃES, P J; RAM, S J. Image processing with ImageJ Part II. **Biophotonics International**, v. 11, n. 7, p. 36–43, 2004.
- ADNAN, L.A. *et al.* Metabolites characterization of laccase mediated Reactive Black 5 biodegradation by fast growing ascomycete fungus *Trichoderma atroviride* F03. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 104, p. 274–282, 2015.
- ALI, S. S. *et al.* Valorizing lignin-like dyes and textile dyeing wastewater by a newly constructed lipid-producing and lignin modifying oleaginous yeast consortium valued for biodiesel and bioremediation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 403, p. 123575, 2021.
- AL-TOHAMY, R. *et al.* Performance of a Newly Isolated Salt-Tolerant Yeast Strain *Sterigmatomyces halophilus* SSA-1575 for Azo Dye Decolorization and Detoxification. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. June, p. 1–19, 2020.
- ALVES, I M.S. *et al.* The diversity, distribution, and pathogenic potential of cultivable fungi present in rocks from the South Shetlands archipelago, Maritime Antarctica. **Extremophiles**, v. 23, n. 3, p. 327–336, 2019.
- AMEND, A. *et al.* Fungi in the marine environment: Open questions and unsolved problems. **mBio**, v. 10, n. 2, p. 1–15, 2019.
- ARENZ, B. E. *et al.* Fungal colonization of exotic substrates in Antarctica. **Fungal Diversity**, v. 49, p. 13–22, 2011.
- ASADI, E; MAKHDOUMI, A; ASOODEH, A. Laccase mediator system obtained from a marine spore exhibits decolorization potential in harsh environmental conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 191, n. January, p. 110184, 2020.
- ASHRAFI, SD *et al.* The enzymatic decolorization and detoxification of synthetic dyes by the laccase from a soil-isolated ascomycete, *Paraconiothyrium variable*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 85, p. 173–181, 2013.
- Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção – ABIT. Acesso em junho.2019. Disponível em <https://www.abit.org.br/>. 2021.
- AZIZ, M; CHAPMAN, K D. Fatty Acid Amide Hydrolases: An Expanded Capacity for Chemical Communication? **Trends in Plant Science**, v. 25, n. 3, p. 236–249, 2020.
- AZMI, O.R; SEPPELT, R.D. Fungi of the Windmill Islands, continental Antarctica. Effect of temperature, pH and culture media on the growth of selected microfungi. **Polar Biology**. Vol. 18. p. 128–134, 1998.
- BANKOLE, P O. *et al.* Degradation of indigo dye by a newly isolated yeast, *Diutina rugosa* from dye wastewater polluted soil. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 5, p. 4639–4648, 2017.
- BENTO, R. M.F. *et al.* Improvements in the enzymatic degradation of textile dyes using ionic-liquid-based surfactants. **Separation and Purification Technology**, v. 235, n. June 2019, p. 116191, 2020.

BERNAL, SP.F. *et al.* Biotechnological potential of microorganisms from textile effluent: Isolation, enzymatic activity and dye discoloration. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 4, p. 1–12, 2021.

BASTIAN, E. Y. O. Guia técnico ambiental da indústria têxtil. São Paulo: CETESB: SINDITÊXTIL, 2009.

BHATIA, D. *et al.* Biological methods for textile dye removal from wastewater: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 19, p. 1836–1876, 2017.

BOGER, D L. *et al.* Fatty acid amide hydrolase substrate specificity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, n. 23, p. 2613–2616, 2000.

BOHACZ, J. Removal of a textile dye (RBBR) from the water environment by fungi isolated from lignocellulosic composts. **Archives of Environmental Protection**, v. 46, n. 2, p. 12–20, 2020.

BONUGLI-SANTOS, *et al.* Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. **Frontiers in Microbiology**. vol.6; 269. 2015.

BONUGLI-SANTOS, R. C. *et al.* 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.

BONUGLI-SANTOS, R. C. *et al.* Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 32–37, 2010.

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, and Soil Pollution**, [s. l.], v. 223, n. 5, p. 2333–2345, 2012.

BOVIO, E. *et al.* Marine Fungi from the sponge *Grantia compressa*: Biodiversity, chemodiversity, and biotechnological potential. **Marine Drugs**, v. 17, n. 220, 2019.

BOVIO, E. *et al.* The culturable mycobiota associated with three Atlantic sponges, including two new species: *Thelebolus balaustiformis* and *T. spongiae*. **Fungal Systematics and Evolution**, v. 1, n. JUNE, p. 141–167, 2018.

BRENELLI, L B. *et al.* Novel redox-active enzymes for ligninolytic applications revealed from multiomics analyses of *Peniophora* sp. CBMAI 1063, a laccase hyper-producer strain. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2019.

BROADY, P. A.; WEINSTEIN, R. N. Algae, lichens and fungi in La Gorce Mountains, Antarctica. **Antarctic Science**, v. 10, n. 4, p. 376–385, 1998.

BRUNO, S. *et al.* Enzymes from marine polar regions and their biotechnological applications. **Marine Drugs**, v. 17, n. 10, p. 1–36, 2019.

BRÜSCHWEILER, B J.; MERLOT, C. Azo dyes in clothing textiles can be cleaved into a series of mutagenic aromatic amines which are not regulated yet. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 88, p. 214–226, 2017.

BUGNI T, IRELAND C. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Nat Prod Rep**. 21(1):143-63. 2004.

BUSINESS WIRE. Textile Global Market Report 2021: COVID-19 Impact and Recovery to 2030. Disponível em <https://www.researchandmarkets.com/reports/5238004/textile-global-market-report-2021-covid-19>. Acesso em outubro de 2021.

CANO, M *et al.* Biotransformation of indigo carmine to isatin sulfonic acid by lyophilized mycelia from *Trametes versicolor*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 57, p. 12224–12231, 2011.

CHOI, K Y. Discoloration of indigo dyes by eco-friendly biocatalysts. **Dyes and Pigments**, v. 184, n. May 2020, p. 108749, 2021.

CHOWDHURY, M.F. *et al.* Current treatment technologies and mechanisms for removal of indigo carmine dyes from wastewater: A review. **Journal of Molecular Liquids**, v. 318, p. 114061, 2020.

CONG, B. *et al.* Isolation, characterization and transcriptome analysis of a novel Antarctic *Aspergillus sydowii* strain MS-19 as a potential lignocellulosic enzyme source. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2017.

COOK, D. J. *et al.* Cytochromes P450: History, Classes, Catalytic Mechanism, and Industrial Application. Insights into Enzyme Mechanisms and Functions from Experimental and Computational Methods. 1. ed. **Elsevier Inc.**, v. 105. Pp. 1-202. 2016.

DALMASO, G Z L; FERREIRA, D; VERMELHO, A. B. Marine extremophiles a source of hydrolases for biotechnological applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 4, p. 1925–1965, 2015.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, n. 3, p. 363-369. 1971.

DESHMUKH, R; KHARDENAVIS, A A.; PUROHIT, H J. Diverse Metabolic Capacities of Fungi for Bioremediation. **Indian Journal of Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 247–264, 2016.

DING, Z. *et al.* Richness and bioactivity of culturable soil fungi from the Fildes Peninsula, Antarctica. **Extremophiles**, v. 20, n. 4, p. 425–435, 2016.

DUARTE, A.W. F. *et al.* Cold-adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 600–619, 2018a.

DUARTE, A.W. F. *et al.* Production of cold-adapted enzymes by filamentous fungi from King George Island, Antarctica. **Polar Biology**, v. 41, n. 12, p. 2511–2521, 2018b.

DURÁN, P *et al.* Occurrence of soil fungi in antarctic pristine environments. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. MAR, p. 1–12, 2019.

FABARA, A N.; FRAAIJE, M W. An overview of microbial indigo-forming enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 3, p. 925–933, 2020.

FERNÁNDEZ, P. M. *et al.* Phenol degradation and heavy metal tolerance of Antarctic yeasts. **Extremophiles**, v. 21, n. 3, p. 445–457, 2017.

FIBRATEX GROUP. Polo têxtil de Americana: veja por que é tão importante para a economia no Brasil. Acesso em dezembro de 2021. Disponível em: <https://fcem.com.br/noticias/polo-textil-de-americana-importante-para-a-economia-do-brasil/>. 2020.

- FLOX, C *et al.* Electro-Fenton and photoelectro-Fenton degradation of indigo carmine in acidic aqueous medium. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 67, n. 1–2, p. 93–104, 2006.
- FONTANA, Michelli *et al.* Efficiency of Heterogeneous Photocatalysis with Titanium Dioxide in the Alteration of Physicochemical and Toxicological Parameters of Textile Effluent. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 231, n. 1, 2020.
- FONTES, B *et al.* Laccases produced by *Peniophora* from marine and terrestrial origin: A comparative study. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 35, 2021.
- GERARDO *et al.* Exploiting a mutualismo: parasite specialization on cultivars within the fungus-growing ants symbiosis. **Proc.R.Soc.Lond.B**, v.271, p.1791-1798, 2004.
- GIOVANELLA, Patricia *et al.* Metal and organic pollutants bioremediation by extremophile microorganisms. **Journal of Hazardous Materials**, v. 382, n. January 2019, p. 121024, 2020.
- GLADFELTER, A S.; JAMES, T Y.; AMEND, A S. Marine fungi. **Current Biology**, v. 29, n. 6, p. R191–R195, 2019.
- GODINHO, V. M. *et al.* Diversity and distribution of hidden cultivable fungi associated with marine animals of Antarctica. **Fungal Biology**, v. 123, n. 7, p. 507–516, 2019.
- GONÇALVES, V N. *et al.* Taxonomy, phylogeny and ecology of cultivable fungi present in seawater gradients across the Northern Antarctica Peninsula. **Extremophiles**, v. 21, n. 6, p. 1005–1015, 2017.
- GONÇALVES, V.N. *et al.* Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 82, n. 2, p. 459–471, 2012.
- GONÇALVES, V.N. *et al.* *Penicillium solitum*: A mesophilic, psychrotolerant fungus present in marine sediments from Antarctica. **Polar Biology**, v. 36, n. 12, p. 1823–1831, 2013.
- GROSSART, H P; ROJAS-JIMENEZ, K. Aquatic fungi: Targeting the forgotten in microbial ecology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 31, p. 140–145, 2016.
- HAMAD, M T. M. H.; SAIED, M S. S. Kinetic studies of Congo red dye adsorption by immobilized *Aspergillus niger* on alginate. **Applied Water Science**, v. 11, n. 2, 2021.
- HAO, C. *et al.* Saturated resin ectopic regeneration by non-thermal dielectric barrier discharge plasma. **Catalysts**, v. 7, n. 12, 2017.
- HAYES, M. A. The *Geomyces* fungi: Ecology and distribution. **BioScience**, v. 62, n. 9, p. 819–823, 2012.
- HERRERA, C S. *et al.* *Pseudocosmospora*, a new genus to accommodate *Cosmospora vilior* and related species. **Mycologia**, v. 105, n. 5, p. 1287–1305, 2013.
- HOOG, G. S. *et al.* Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antarctica. **Studies in Mycology**, v. 51, n. January, p. 33–76, 2005.
- HUGHES, K; A.; BRIDGE, p; CLARK, M. S. Tolerance of Antarctic soil fungi to hydrocarbons. **Science of the Total Environment**, v. 372, n. 2–3, p. 539–548, 2007.
- HUSSAIN, Razak *et al.* Fungal P450 monooxygenases - the diversity in catalysis and their promising roles in biocontrol activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 3, p. 989–999, 2020.

- HUY, N. D. *et al.* Synthetic dyes removal by *Fusarium oxysporum* HUIB02 and stimulation effect on laccase accumulation. **Environmental Technology and Innovation**, v. 19, p. 101027, 2020.
- IMRAN, M *et al.* Microbial biotechnology for decolorization of textile wastewaters. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 73–92, 2015.
- JURJEVIC, Z; PETERSON, S W.; HORN, B W. *Aspergillus* section *Versicolores*: Nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. **IMA Fungus**, v. 3, n. 1, p. 59–79, 2012.
- KAHRAMAN, S *et al.* Removal of indigo carmine from an aqueous solution by fungus *Pleurotus ostreatus*. **Archives of Environmental Protection**, v. 38, n. 3, p. 51–57, 2012.
- KIISKINEN, L. L.; RÄTTÖ, M.; KRUUS, K. Screening for novel laccase-producing microbes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 3, p. 640–646, 2004.
- KOCHKINA, G. A. *et al.* Fungal diversity in the Antarctic active layer. **Microbiology (Russian Federation)**, v. 83, n. 1–2, p. 94–101, 2014.
- KOCHKINA, G. A. *et al.* Halo- and psychrotolerant *Geomyces* fungi from arctic cryopegs and marine deposits. **Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 31–38, 2007.
- KUMAR, A; CHANDRA, R. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. **Heliyon**, v. 6, n. 2, p. e03170, 2020.
- KUMAR S. *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution** 35:1547-1549, 2018.
- LADE, H S. *et al.* Enhanced biodegradation and detoxification of disperse azo dye Rubine GFL and textile industry effluent by defined fungal-bacterial consortium. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 72, p. 94–107, 2012.
- LEVIN, L; MELIGNANI, E; RAMOS, A.M. Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4554–4563, 2010.
- LI, H. *et al.* Reductive decolorization of indigo carmine dye with *Bacillus* sp. MZS10. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 103, p. 30–37, 2015a.
- LI, H. *et al.* Manganese peroxidase production from cassava residue by *Phanerochaete chrysosporium* in solid state fermentation and its decolorization of indigo carmine. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 1, p. 227–233, 2015b.
- LI, W T *et al.* Antibacterial constituents from Antarctic fungus, *Aspergillus sydowii* SP-1. **Natural Product Research**, v. 32, n. 6, p. 662–667, 2018.
- LI, L *et al.* A Comprehensive Review of the Mycelial Pellet: Research Status, Applications, and Future Prospects. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 59, n. 39, p. 16911–16922, 2020.
- LI-HONG, Y *et al.* Univariate degradation of indigo carmine in aqueous solution by inactivated biomass in *Heterobasidion insulare*: Preliminary studies. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 25, n. 5, p. 2221–2225, 2016.

- LOPES, L *et al.* Production of fungal enzymes in Macaúba coconut and enzymatic degradation of textile dye. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, n. May, 2020.
- LOQUE, C. P. *et al.* Fungal community associated with marine macroalgae from Antarctica. **Polar Biology**, v. 33, n. 5, p. 641–648, 2010.
- LUESCHOW, S R. *et al.* Opportunistic pseudogymnoascus and geomyces species isolated from humans and bats. **Sydowia**, v. 71, n. February, p. 25–33, 2020.
- MAINARDI, P.H. *et al.* Laccase production in bioreactor scale under saline condition by the marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063. **Fungal Biology**, v. 122, n. 5, p. 302–309, 2018.
- MALLOCH, D *et al.* Fungi associated with hibernating bats in New Brunswick caves: The genus *Leuconeurospora*. **Botany**, v. 94, n. 12, p. 1171–1181, 2016.
- MARTORELL, M. M. *et al.* Biodiversity and enzymes bioprospection of Antarctic filamentous fungi. **Antarctic Science**, v. 31, n. 1, p. 3–12, 2019.
- MENDOZA-AVILA, J; CHAUHAN, K; VAZQUEZ-DUHALT, R. Enzymatic synthesis of indigo-derivative industrial dyes. **Dyes and Pigments**, v. 178, n. March, p. 108384, 2020.
- MENEZES, C. B.A. *et al.* Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 466–482, 2010.
- MENEZES, G.C.A *et al.* Fungi in glacial ice of Antarctica: diversity, distribution and ioprospecting of bioactive compounds. **Extremophiles**, v. 24, n. 3, p. 367–376, 2020.
- MIN, C.A *et al.* Comparison of *Candida Albicans* Fatty Acid Amide Hydrolase Structure with Homologous Amidase Signature Family Enzymes. **Crystals**, v. 9, n. 9, p. 472, 10 set. 2019.
- MINNIS, A M.; LINDNER, D L. Phylogenetic evaluation of *Geomyces* and allies reveals no close relatives of *Pseudogymnoascus destructans*, comb. nov., in bat hibernacula of eastern North America. **Fungal Biology**, v. 117, n. 9, p. 638–649, 2013.
- MISHRA, A; MALIK, A. Novel fungal consortium for bioremediation of metals and dyes from mixed waste stream. **Bioresource Technology**, v. 171, n. 1, p. 217–226, 2014.
- MÖLLER *et al.*; A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucl. Acids Res.** v.20., n.22, p.6115-6116, 1992.
- MYCOBANK. Acesso em 01.10.2021. Disponível em <https://www.mycobank.org/>.
- NEI M; KUMAR S. Molecular Evolution and Phylogenetics. **Oxford University Press**, New York. 2000.
- NELSON, David R. Cytochrome P450 diversity in the tree of life. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1866, n. 1, p. 141–154, 2018.
- NIKOLAIVITS, E *et al.* Unraveling the detoxification mechanism of 2,4-dichlorophenol by marine-derived mesophotic symbiotic fungi isolated from marine invertebrates. **Marine Drugs**, v. 17, n. 10, p. 1–11, 2019.

- OGAKI, M. B. *et al.* Diversity and bioprospecting of cultivable fungal assemblages in sediments of lakes in the Antarctic Peninsula. **Fungal Biology**, v. 124, n. 6, p. 601–611, 2020.
- ORTEGA, S.N. *et al.* Isolation of Brazilian marine fungi capable of growing on DDD pesticide. **Biodegradation**, v. 22, n. 1, p. 43–50, 2011.
- OTERO, I.V.R. *et al.* De novo transcriptome assembly: a new laccase multigene family from the marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063. **AMB Express**, v. 7, n. 1, 2017.
- PANG, K. L. *et al.* ‘Marine fungi’ and ‘marine-derived fungi’ in natural product chemistry research: Toward a new consensual definition. **Fungal Biology Reviews**, v. 30, n. 4, p. 163–175, 2016.
- PARK, H. *et al.* Comprehensive genomic and transcriptomic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a mycoremediation fungus, *Dentipellis* sp. KUC8613. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 19, p. 8145–8155, 2019.
- PICARD, K. T. Coastal marine habitats harbor novel early-diverging fungal diversity. **Fungal Ecology**, v. 25, p. 1–13, 2017.
- PODGORNIK, H; POLJANŠEK, I; PERDIH, A. Transformation of Indigo carmine by *Phanerochaete chrysosporium* ligninolytic enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 2–3, p. 166–172, 2001.
- POLI, A *et al.* Microbial Diversity in Extreme Marine Habitats and Their Biomolecules. **Microorganisms**, v. 5, n. 2, p. 25, 2017.
- PRICELIUS, S. *et al.* Enzymatic reduction of azo and indigoid compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 2, p. 321–327, 2007.
- RAJENDRAN, R. *et al.* Biodecolorization and bioremediation of denim industrial wastewater by adapted bacterial consortium immobilized on inert polyurethane foam (PUF) matrix: A first approach with biobarrier model. **Polish Journal of Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 329–338, 2015.
- RAMOS, M. D. N. *et al.* A critical analysis of the alternative treatments applied to effluents from Brazilian textile industries. **Journal of Water Process Engineering**, v. 43, n. August, 2021.
- RAMSAY, J. A.; NGUYEN, T. Decoloration of textile dyes by *Trametes versicolor* and its effect on dye toxicity. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 21, p. 1757–1761, 2002.
- RAMYA, M; ANUSHA, B; KALAVATHY, S. Decolorization and biodegradation of Indigo carmine by a textile soil isolate *Paenibacillus larvae*. **Biodegradation**, v. 19, n. 2, p. 283–291, 2008.
- RASHID, R *et al.* A state-of-the-art review on wastewater treatment techniques: the effectiveness of adsorption method. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 8, p. 9050–9066, 2021.
- ROBINSON, C. H. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. **New Phytologist**, v. 151, n. 2, p. 341–353, 2001.
- ROSA, L H *et al.* Opportunistic fungi found in fairy rings are present on different moss species in the Antarctic Peninsula. **Polar Biology**, v. 43, n. 5, p. 587–596, 2020.

- ROVIRA, J; DOMINGO, J L. Human health risks due to exposure to inorganic and organic chemicals from textiles: A review. **Environmental Research**, v. 168, n. September 2018, p. 62–69, 2019.
- RUISI, S. *et al.* Fungi in Antarctica. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 6, n. 1–3, p. 127–141, 2007.
- SAILI, N. S. *et al.* Lignocellulolytic activities among *Trichoderma* isolates from Lahad Datu, Sabah and Deception Island, Antarctic. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, v. 6, n. 5, p. 295–302, 2014.
- SAMSAMI, S *et al.* Recent advances in the treatment of dye-containing wastewater from textile industries: Overview and perspectives. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 143, p. 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, p. 1–15, 2020.
- SAROJ, S. *et al.* Biodegradation of azo dyes Acid Red 183, Direct Blue 15 and Direct Red 75 by the isolate *Penicillium oxalicum* SAR-3. **Chemosphere**, v. 107, p. 240–248, 2014.
- SAROJ, S. *et al.* Evaluation of the efficacy of a fungal consortium for degradation of azo dyes and simulated textile dye effluents. **Sustainable Water Resources Management**, v. 1, n. 3, p. 233–243, 2015.
- SAZANOVA, K. V. *et al.* Metabolomic Profiling and Lipid Composition of Arctic and Antarctic Strains of Micromycetes *Geomyces pannorum* and *Thelebolus microsporus* Grown at Different Temperatures. **Microbiology (Russian Federation)**, v. 88, n. 3, p. 282–291, 2019.
- SCHWARZ, A. *et al.* Response of the fungal community to chronic petrogenic contamination in surface and subsurface soils. **Geoderma**, v. 338, n. December 2018, p. 206–215, 2019.
- SHAH, M *et al.* Antibacterial Polyketides from Antarctica Sponge-Derived Fungus *Penicillium* sp. HDN151272. **Marine Drugs**, v. 18, n. 2, p. 71, 23 jan. 2020.
- SHAKEEL, M. *et al.* Biodegradation by Co-inoculated Bacteria and Fungi Alleviates Adverse Effects of Red-S3B on Growth and Nitrogen Uptake of Wheat. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 48, n. 3, p. 1–9, 2020.
- SHANMUGAM, S. *et al.* Enhanced biodegradation and detoxification of malachite green by *Trichoderma asperellum* laccase: Degradation pathway and product analysis. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 125, p. 258–268, 2017.
- SHARIFIAN, S *et al.* New insights on the marine cytochrome P450 enzymes and their biotechnological importance. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 142, p. 811–821, 2020.
- SHARMA, B; DANGI, A K; SHUKLA, P. Contemporary enzyme-based technologies for bioremediation: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 210, p. 10–22, 2018.
- SHI, T *et al.* New Polyketides from the Antarctic Fungus *Pseudogymnoascus* sp. HSX2#-11. **Marine drugs**, v. 19, n. 3, p. 1–9, 2021.

SINGH, L; SINGH, VP. Decolourization of Azo (Acid Red) and Anthraquinonic (Basic Blue) Dyes by the Fungus *Aspergillus flavus*. **International Journal of Biomedical Engineering and Clinical Science**, v. 3, n. 1, p. 1, 2017.

STEFFEN, K.; HATAKKA, A.; HOFRICHTER, M. Removal and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 1–2, p. 212–217, 2002.

SYAFIUDDIN, A; FULAZZAKY, M A. Decolorization kinetics and mass transfer mechanisms of Remazol Brilliant Blue R dye mediated by different fungi. **Biotechnology Reports**, v. 29, 2021.

TANG, W. *et al.* Decolorization and degradation analysis of Disperse Red 3B by a consortium of the fungus: *Aspergillus* sp. XJ-2 and the microalgae *Chlorella sorokiniana* XJK. **RSC Advances**, v. 9, n. 25, p. 14558–14566, 2019.

TERRES, J. *et al.* Decolorization and degradation of Indigo Carmine dye from aqueous solution catalyzed by horseradish peroxidase. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, n. 1, p. 64–73, 2014.

TIAN, C. *et al.* Decolorization of indigo dye and indigo dye-containing textile effluent by *Ganoderma weberianum*. **African Journal of Microbiology Research**. v. 7, n. 11, p. 941–947, 2013.

TKACZYK, A; MITROWSKA, K; POSYNIAK, A. Synthetic organic dyes as contaminants of the aquatic environment and their implications for ecosystems: A review. **Science of the Total Environment**, v. 717, p. 137222, 2020.

TOSI, S. *et al.* Antioxidant enzyme activity of filamentous fungi isolated from Livingston Island, maritime Antarctica. **Polar Biology**, v. 33, n. 9, p. 1227–1237, 2010.

TSUJI, M. Cold-stress responses in the antarctic basidiomycetous yeast *Mrakia blollopis*. **Royal Society Open Science**, v. 3, n. 7, 2016.

TSUJI, M. *et al.* Cold adaptation of fungi obtained from soil and lake sediment in the Skarvsnes ice-free area, Antarctica. **FEMS Microbiology Letters**, v. 346, n. 2, p. 121–130, 2013.

VALDEZ-VAZQUEZ, I *et al.* Simultaneous hydrogen production and decolorization of denim textile wastewater: kinetics of decolorizing of indigo dye by bacterial and fungal strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 701–709, 2020.

VARJANI, S *et al.* Microbial degradation of dyes: An overview. **Bioresource Technology**, v. 314, n. May, 2020.

VASCONCELOS, M.R.S. *et al.* Pyrene degradation by marine-derived ascomycete: process optimization, toxicity, and metabolic analyses. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 12, p. 12412–12424, 2019.

VAZ, A B. M *et al.* The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 937–947, set. 2011.

VIEIRA, G A L *et al.* Marine associated microbial consortium applied to RBBR textile dye detoxification and decolorization: Combined approach and metatranscriptomic analysis. **Chemosphere**, v. 267, 2021.

- VIEIRA, G. A.L. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by marine-derived basidiomycetes: optimization of the degradation process. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 749–756, 2018.
- WANG, X. *et al.* Validation of germination rate and root elongation as indicator to assess phytotoxicity with *Cucumis sativus*. **Chemosphere**, v. 44, n. 8, p. 1711–1721, 2001.
- WANG, J. *et al.* Identification of the cytochrome P450 involved in the degradation of neonicotinoid insecticide acetamiprid in *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 371, n. March, p. 494–498, 2019.
- WENTZEL, L. C. P. *et al.* Fungi from Admiralty Bay (King George Island, Antarctica) Soils and Marine Sediments. **Microbial Ecology**, v. 77, n. 1, p. 12–24, 2019.
- YAKOP, F; TAHA, H; SHIVANAND, P. Isolation of fungi from various habitats and their possible bioremediation. **Current Science**, v. 116, n. 5, p. 733–740, 2019.
- YAVUZ, M; KAYA, G; AYTEKIN, Ç. Using *Ceriporiopsis subvermispora* CZ-3 laccase for indigo carmine decolourization and denim bleaching. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 88, p. 199–205, 2014.
- YOGABAANU, U. *et al.* Antimicrobial properties and the influence of temperature on secondary metabolite production in cold environment soil fungi. **Polar Science**, v. 14, p. 60–67, 2017.
- YOUNES, S *et al.* Extracellular Enzymatic Activities of Bacterial Strains Isolated from Tunisian Biotopes: Decolorization and Detoxification of Indigo Carmine. **Catalysis Letters**, 2020.
- ZAFRA, G.; CORTÉS-ESPINOSA, D. V. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Trichoderma* species: a mini review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 24, p. 19426–19433, 2015.
- ZAPATA-CASTILLO, P. *et al.* Synergistic action of laccases from *Trametes hirsuta* Bm2 improves decolourization of indigo carmine. **Letters in Applied Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 252–258, 2015.
- ZHANG, S. J. *et al.* Biosorption of reactive dyes by the mycelium pellets of a new isolate of *Penicillium oxalicum*. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 17, p. 1479–1482, 2003.
- ZHANG, H. *et al.* Characterization of a manganese peroxidase from white-rot fungus *Trametes* sp.48424 with strong ability of degrading different types of dyes and polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Hazardous Materials**, v. 320, p. 265–277, 2016.

APÊNDICES

Apêndice A. Resultados mais similares obtidos no BLASTn no banco de dados NCBI.

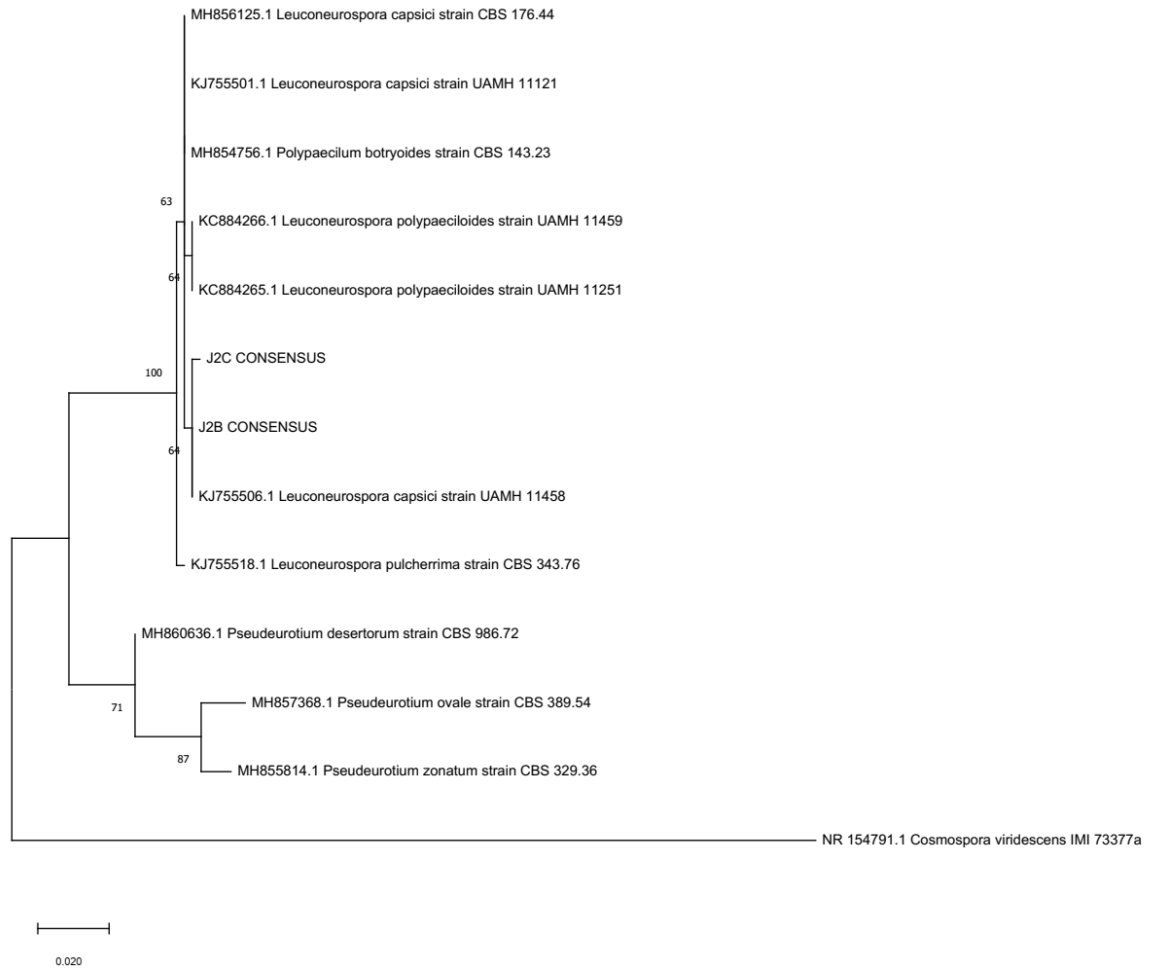
Isolado	Resultados com maior similaridade BLASTn	Identidade (%)	Número de acesso GenBank	Identificação final
J2A	<i>Penicillium oxalicum</i> strain CBS 219.30	99.61%	MH855125.1	<i>Penicillium</i> cf. <i>oxalicum</i>
	<i>Penicillium asturianum</i> strain CBS 173.81	99.61%	MH861321.1	
	<i>Penicillium oxalicum</i> NRRL 787	99.59%	NR_121232.1	
	<i>Penicillium soosanum</i> CCF 3778	98.55%	NR_173354.1	
	<i>Penicillium mariae-crucis</i> strain CBS 270.83	97.28%	MH861584.1	
J2B	<i>Aspergillus capsici</i> isolate IVA-389A	99.80%	MN833370.1	<i>Leuconeurospora</i> sp.
	<i>Leuconeurospora</i> sp. isolate AK07KG1	99.59%	KY623479.1	
	<i>Leuconeurospora capsici</i> strain CBS 176.44	99.59%	MH856125.1	
	[<i>Polypaecilum</i>] <i>botryoides</i> strain CBS 143.23	99.59%	MH854756.1	
	<i>Leuconeurospora capsici</i> strain UAMH 11458	99.79%	KJ755506.1	
J2C	<i>Aspergillus capsici</i> isolate IVA-389A	100.00%	MN833370.1	<i>Leuconeurospora</i> sp.
	<i>Leuconeurospora capsici</i> strain UAMH 11458	100.00%	KJ755506.1	
	<i>Pseudeurotium</i> sp. VKM-3198	100.00%	JN835209.1	
	<i>Leuconeurospora capsici</i> strain CBS 176.44	99.79%	MH856125.1	
	<i>Leuconeurospora capsici</i> strain UAMH 11121	99.79%	KJ755501.1	
J2D	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> strain UAMH 10579 1	99.38%	KJ755525.1	<i>Geomyces</i> sp. ou <i>Pseudogymnoascus</i> sp.
	<i>Pseudogymnoascus roseus</i> CBS 395.65	98.54%	NR_165894.1	
	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> ATCC MYA-4855	98.54%	NR_111838.1	
	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> UAMH 10579	98.35%	NR_111197.1	
	<i>Geomyces pannorum</i> var. <i>asperulatus</i> voucher UAMH 183	98.35%	DQ117444.1	
J2E1	<i>Aspergillus versicolor</i> strain CBS 583.65	100.00%	EU076360.1	<i>Aspergillus</i> cf. <i>creber</i>
	<i>Aspergillus jensenii</i> NRRL 58600	99.59%	NR_135444.1	
	<i>Aspergillus creber</i> NRRL 58592	99.59%	NR_135442.1	
	<i>Aspergillus tennesseensis</i> NRRL 13150	99.58%	NR_135447.1	
	<i>Aspergillus versicolor</i> ATCC 9577	98.76%	NR_131277.1	

J2E2	<i>Aspergillus versicolor</i> strain CBS 583.65	100.00%	EU076360.1	<i>Aspergillus</i> cf. creber
	<i>Aspergillus jensenii</i> NRRL 58600	99.79%	NR_135444.1	
	<i>Aspergillus creber</i> NRRL 58592	99.38%	NR_135442.1	
	<i>Aspergillus tennesseensis</i> NRRL 13150	99.79%	NR_135447.1	
	<i>Aspergillus protuberus</i> NRRL 3505	98.96%	NR_135353.1	
J2F	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> strain UAMH 10579	99.18%	KJ755525.1	<i>Geomyces</i> sp. ou <i>Pseudogymnoascus</i> sp.
	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> UAMH 10579	98.18%	NR_111197.1	
	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> ATCC MYA-4855	98.37%	NR_111838.1	
	<i>Geomyces pannorum</i> var. <i>asperulatus</i> voucher UAMH 183	98.17%	DQ117444.1	
	<i>Pseudogymnoascus roseus</i> CBS 395.65	98.36%	NR_165894.1	
J8A	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> strain UAMH 10579 1	99.38%	KJ755525.1	<i>Geomyces</i> sp. ou <i>Pseudogymnoascus</i> sp.
	<i>Pseudogymnoascus roseus</i> CBS 395.65	98.76%	NR_165894.1	
	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> ATCC MYA-4855	98.55%	NR_111838.1	
	<i>Geomyces pannorum</i> var. <i>asperulatus</i> voucher UAMH 183	98.35%	DQ117444.1	
	<i>Pseudogymnoascus appendiculatus</i> UAMH 10509	97.93%	NR_137875.1	
J8B1	<i>Cosmospora viridescens</i> IMI 73377a	99.18%	NR_154791.1	<i>Cosmospora</i> sp. ou <i>Pseudocosmospora</i> sp.
	<i>Cosmospora arxii</i> CBS 748.69	98.99%	NR_145062.1	
	<i>Cosmospora stegonsporii</i> CBS 122305	98.77%	NR_159868.1	
	<i>Cosmospora butyri</i> strain CBS 301.38	98.71%	MW827605.1	
	<i>Cosmospora aquatica</i> MFLU 15-0072	98.70%	NR_168211.1	
J8B2	<i>Cosmospora viridescens</i> IMI 73377a	99.17%	NR_154791.1	<i>Cosmospora</i> sp. ou <i>Pseudocosmospora</i> sp.
	<i>Cosmospora aquatica</i> MFLU 15-0072	98.76%	NR_168211.1	
	<i>Cosmospora butyri</i> strain CBS 301.38	98.55%	MW827605.1	
	<i>Cosmospora fomiticola</i> PDD 46398	98.55%	NR_165845.1	
	<i>Cosmospora arxii</i> CBS 748.69	98.55%	NR_145062.1	
J8D	<i>Trichoderma atroviride</i> isolate CBS 142.95	100.00%	AF456917.1	<i>Trichoderma</i> sp.
	<i>Trichoderma scalesiae</i> CBS 120069	99.81%	NR_144876.1	
	<i>Trichoderma neokoningii</i> CBS 120070	99.44%	NR_138446.1	

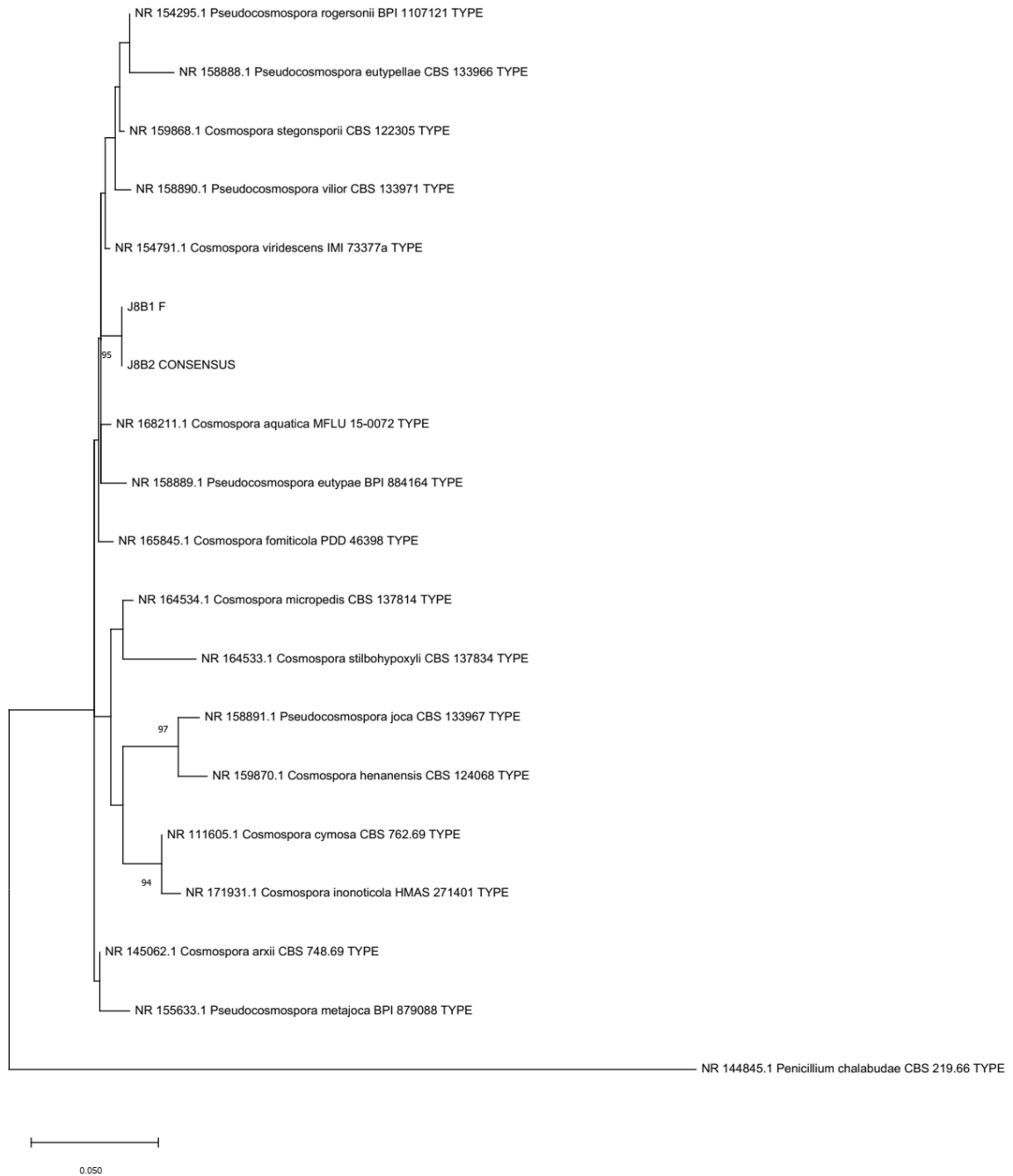
	<i>Trichoderma martiale</i> BPI GJS 04-40	99.44%	NR_134363.1	
	<i>Trichoderma dorotheopsis</i> isolate HZA5	99.26%	MH624140.1	
D2A	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> strain UAMH 10579	99.40%	KJ755525.1	<i>Geomyces</i> sp. ou <i>Pseudogymnoascus</i> sp.
	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> ATCC MYA-4855	98.61%	NR_111838.1	
	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> UAMH 10579	98.42%	NR_111197.1	
	<i>Pseudogymnoascus roseus</i> CBS 395.65	98.57%	NR_165894.1	
	<i>Pseudogymnoascus appendiculatus</i> UAMH 10509	97.99%	NR_137875.1	
D2B	<i>Thelebolus balaustiformis</i> MUT 2357	99.75%	NR_159056.1	<i>Thelebolus</i> sp.
	<i>Thelebolus globosus</i> CBS 113940	99.50%	NR_138367.1	
	<i>Thelebolus spongiae</i> MUT 2359	99.24%	NR_159057.1	
	<i>Thelebolus ellipsoideus</i> CBS 113938	98.75%	NR_160216.1	
	<i>Cleistothelebolus nipigonensis</i> CBS 778.70	95.48%	NR_164284.1	
	<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> CBS 100573	94.78%	NR_164292.1	
D2C	<i>Penicillium asturianum</i> strain CBS 173.81	99.80%	MH861321.1	<i>Penicillium</i> cf. <i>oxalicum</i>
	<i>Penicillium oxalicum</i> strain CBS 219.30	99.80%	MH855125.1	
	<i>Penicillium oxalicum</i> NRRL 787	99.80%	NR_121232.1	
	<i>Penicillium araracuarensense</i> CBS 113149	96.99%	NR_119814.1	
	<i>Penicillium mariae-crucis</i> CBS 271.83	96.79%	NR_111506.1	
D2D	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> strain UAMH 10579	98.83%	KJ755525.1	<i>Geomyces</i> sp. ou <i>Pseudogymnoascus</i> sp.
	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> ATCC MYA-4855	98.60%	NR_111838.1	
	<i>Geomyces destructans</i> isolate 20631-21	98.60%	EU884921.1	
	<i>Pseudogymnoascus roseus</i> CBS 395.65	98.37%	NR_165894.1	
	<i>Pseudogymnoascus appendiculatus</i> UAMH 10509	97.90%	NR_137875.1	
D2P	<i>Penicillium asturianum</i> strain CBS 173.81	99.80%	MH861321.1	<i>Penicillium</i> cf. <i>oxalicum</i>
	<i>Penicillium oxalicum</i> strain CBS 219.30	99.80%	MH855125.1	
	<i>Penicillium oxalicum</i> NRRL 787	99.80%	NR_121232.1	
	<i>Penicillium soosanum</i> CCF 3778	98.63%	NR_173354.1	
	<i>Penicillium araracuarensense</i> CBS 113149	96.67%	NR_119814.1	

	<i>Geomyces destructans</i> isolate 20631-21	97.84%	EU884921.1	
	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> ATCC MYA-4855	97.76%	NR_111838.1	
D8A	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> UAMH 10579	97.55%	NR_111197.1	<i>Geomyces</i> sp. ou <i>Pseudogymnoascus</i> sp.
	<i>Pseudogymnoascus roseus</i> CBS 395.65	97.52%	NR_165894.1	
	<i>Pseudogymnoascus appendiculatus</i> UAMH 10509	97.05%	NR_137875	
	<i>Thelebolus balaustiformis</i> MUT 2357	100.00%	NR_159056.1	
	<i>Thelebolus globosus</i> CBS 113940	99.58%	NR_138367.1	
	<i>Thelebolus globosus</i> CBS 113940	99.58%	NR_138367.1	
D8B	<i>Thelebolus spongiae</i> MUT 2359	99.16%	NR_159057.1	<i>Thelebolus</i> sp.
	<i>Thelebolus ellipsoideus</i> CBS 113938	98.74%	NR_160216.1	
	<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> CBS 100573	95.19%	NR_164292.1	
	<i>Aspergillus sydowii</i> CBS 593.65	100.00%	NR_131259.1	
	<i>Aspergillus jensenii</i> NRRL 58600	98.78%	NR_135444.1	
D8C1	<i>Aspergillus versicolor</i> ATCC 9577	98.57%	NR_131277.1	<i>Aspergillus</i> cf. <i>sydowii</i>
	<i>Aspergillus protuberus</i> NRRL 3505	98.57%	NR_135353.1	
	<i>Aspergillus tabacinus</i> NRRL 4791	98.37%	NR_135361.1	
	<i>Aspergillus sydowii</i> CBS 593.65	100.00%	NR_131259.1	
	<i>Aspergillus jensenii</i> NRRL 58600	98.95%	NR_135444.1	
D8C2	<i>Aspergillus cvjetkovicii</i> isolate NRRL 227	98.95%	EF652440.1	<i>Aspergillus</i> cf. <i>sydowii</i>
	<i>Aspergillus versicolor</i> ATCC 9577	98.54%	NR_131277.1	
	<i>Aspergillus tennesseensis</i> NRRL 13150	99.14%	NR_135447.1	

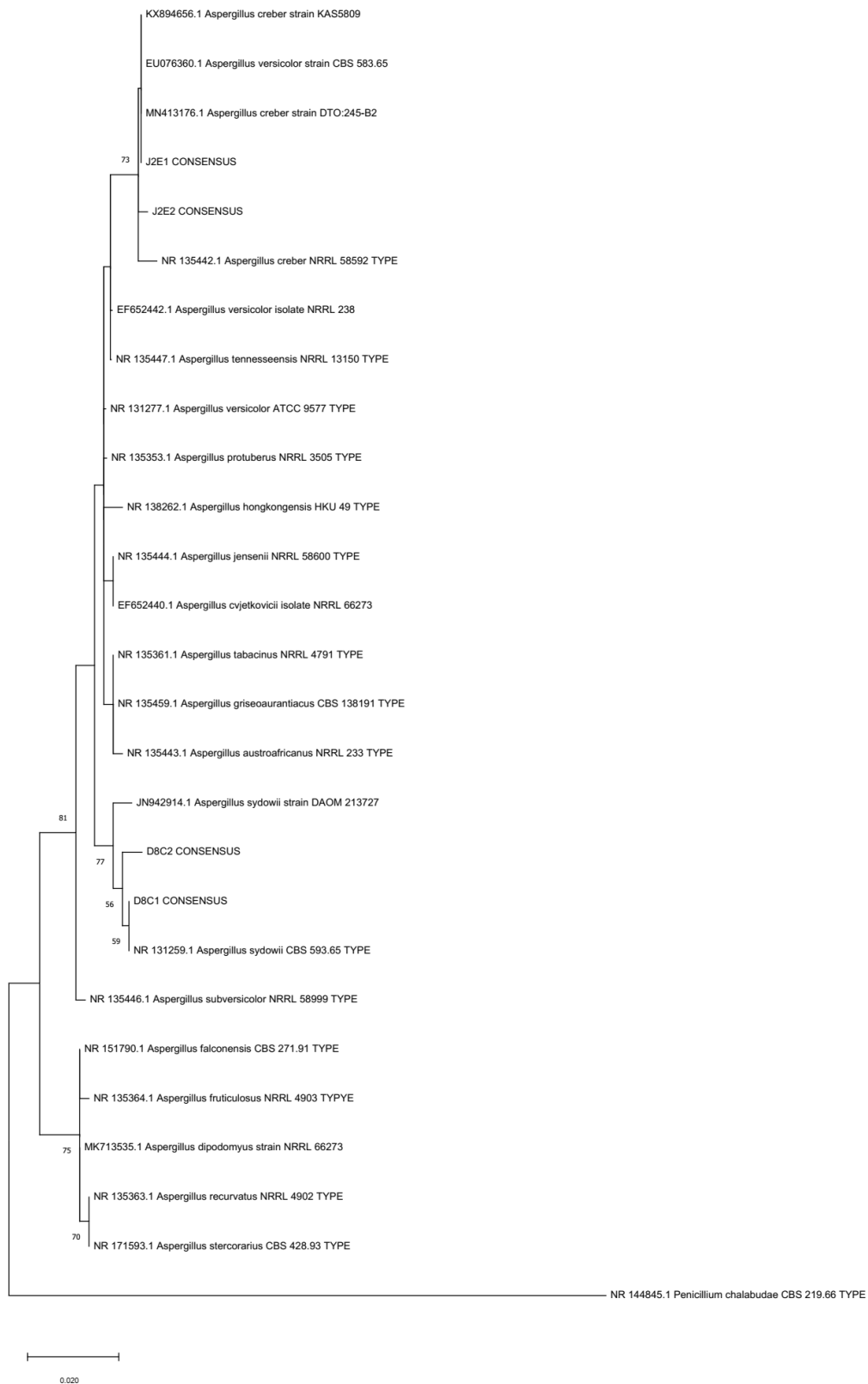
Apêndice B. Filograma para marcador ITS dos isolados J2B e J2C, identificados como *Leuconeurospora* sp. Análise de máxima verossimilhança com modelo de substituição GTR e 1000 réplicas de Bootstrap realizados no MEGAX.



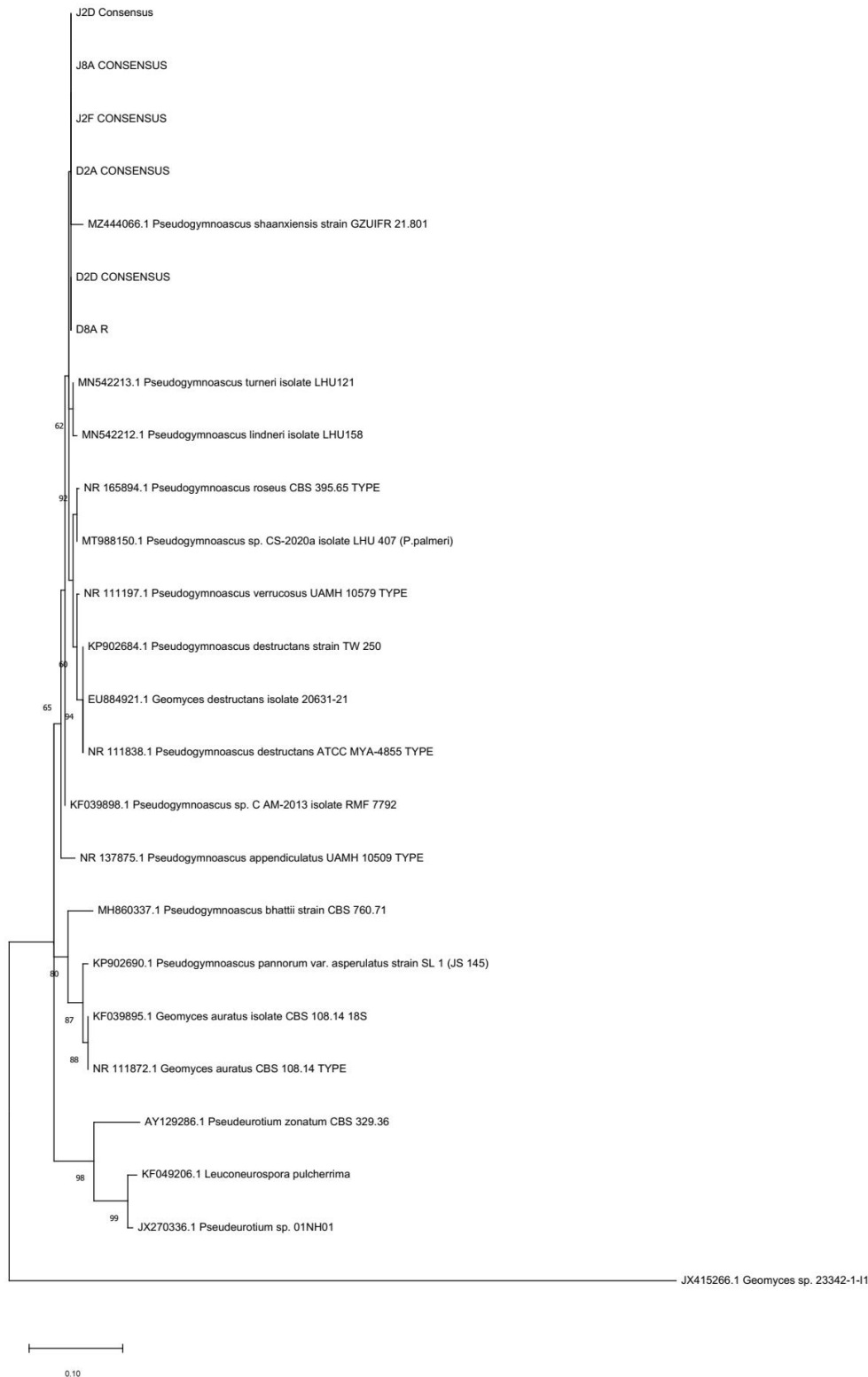
Apêndice C. Filograma para marcador ITS dos isolados J8B1 e J8B2, identificados como *Cosmospora* sp. ou *Pseudocosmospora* sp. Análise de máxima verossimilhança com modelo de substituição GTR e 1000 réplicas de Bootstrap realizados no MEGAX.



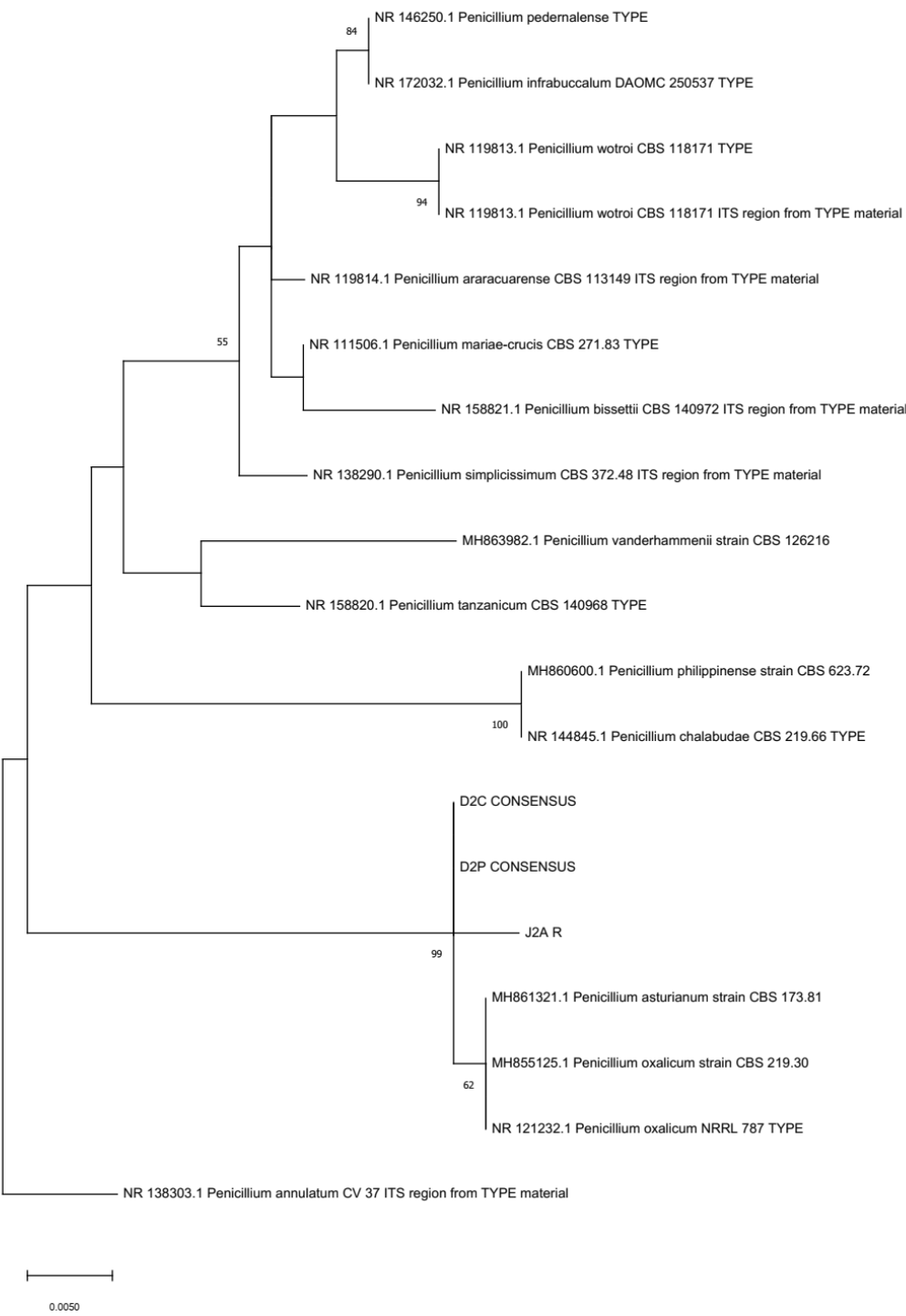
Apêndice D. Filograma para marcador ITS dos isolados J2E1, J2E2, D8C1 e D8C2, identificados como *Aspergillus cf. creber* e *Aspergillus cf. sydowii*. Análise de máxima verossimilhança com modelo de substituição GTR e 1000 réplicas de Bootstrap realizados no MEGAX.



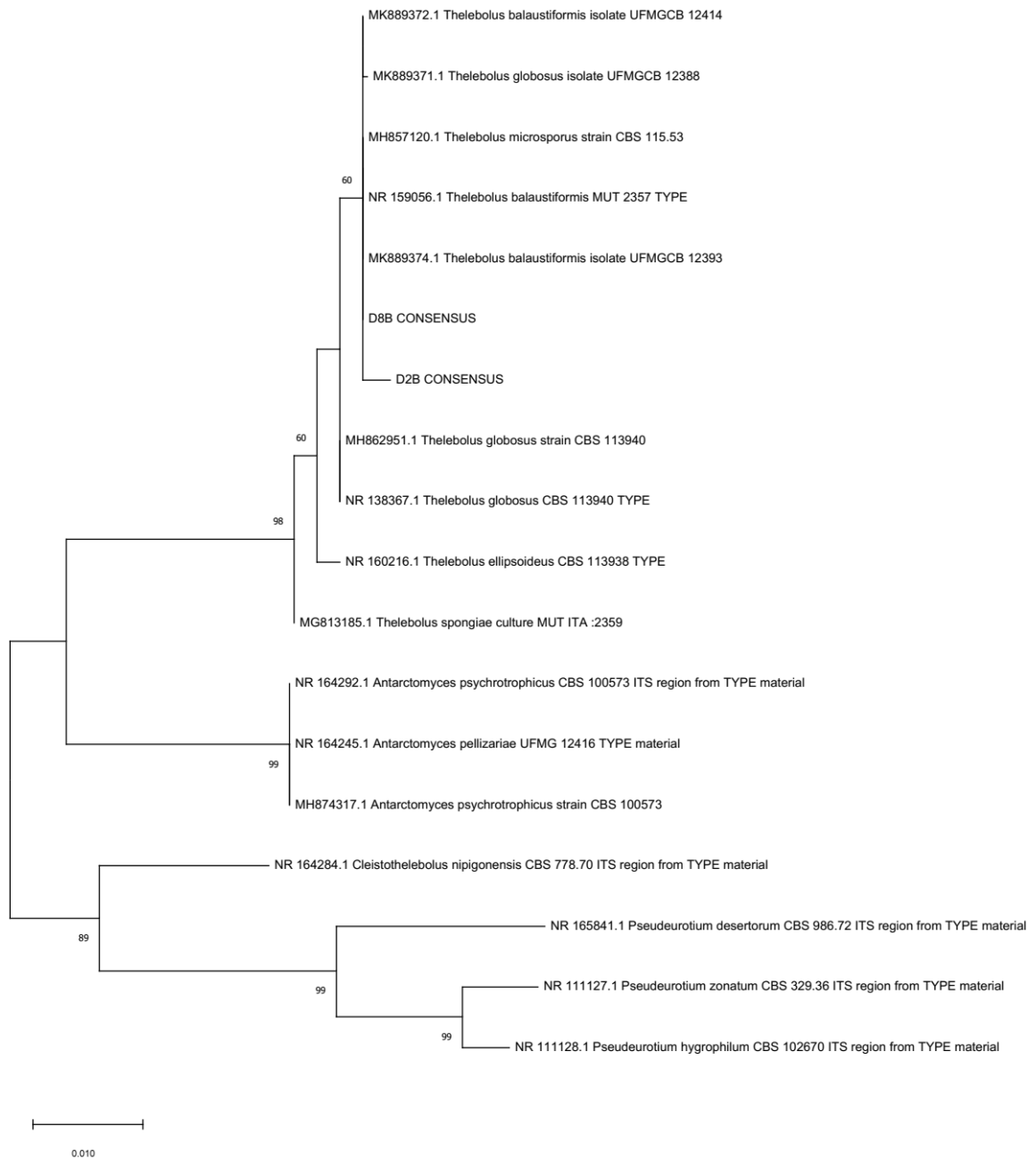
Apêndice E. Filograma para marcador ITS dos isolados J2D, J2F, J8A, D2A, D2D e D8A, identificados como *Geomyces* sp. ou *Pseudogymnoascus* sp. Análise de máxima verossimilhança com modelo de substituição GTR e 1000 réplicas de Bootstrap realizados no MEGAX.



Apêndice F . Filograma para marcador ITS dos isolados J2A, D2C e D2P, identificados como *Penicillium cf. oxalicum*. Análise de máxima verossimilhança com modelo de substituição GTR e 1000 réplicas de Bootstrap realizados no MEGAX.



Apêndice G. Filograma para marcador ITS dos isolados D2B e D8B, identificados como *Thelebolus* sp. Análise de máxima verossimilhança com modelo de substituição GTR e 1000 réplicas de Bootstrap realizados no MEGAX.



Apêndice H. Filograma para marcador ITS dos isolados J8D, identificado como *Trichoderma* sp. Análise de máxima verossimilhança com modelo de substituição GTR e 1000 réplicas de Bootstrap realizados no MEGAX.

