



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOCÊNCIAS**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS E FUNGOS
ISOLADOS DE UMA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE INDUSTRIA TÊXTIL**

SUZAN PRADO FERNANDES BERNAL

Foz do Iguaçu
2020



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS
DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOCÊNCIAS**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS E FUNGOS
ISOLADOS DE UMA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE INDÚSTRIA TÊXTIL**

SUZAN PRADO FERNANDES BERNAL

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini


Foz do Iguaçu
2020

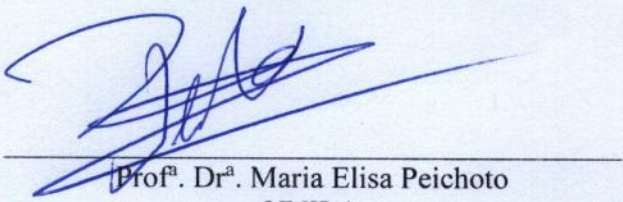
SUZAN PRADO FERNANDES BERNAL

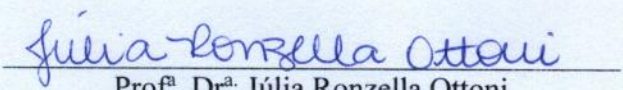
**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS E FUNGOS
ISOLADOS DE UMA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE INDÚSTRIA TÊXTIL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Biociências.

BANCA EXAMINADORA


Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini
UNILA


Prof.^a. Dr.^a. Maria Elisa Peichoto
UNILA


Prof.^a. Dr.^a. Júlia Ronzella Ottoni
UDC

Foz do Iguaçu, 27 de fevereiro de 2020.

Catálogo elaborado pela Divisão de Apoio ao Usuário da Biblioteca Latino-Americana
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA

B517a

Bernal, Suzan Prado Fernandes.

Avaliação do potencial biotecnológico de bactérias e fungos isolados de uma estação de tratamento de indústria têxtil / Suzan Prado Fernandes Bernal. - Foz do Iguaçu, 2020.

135 f.: il.

Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Biociências.

Orientador: Michel Rodrigo Zambrano Passarini.

1. Biotecnologia - Indústria. 2. Indústria têxtil. I. Passarini, Michel Rodrigo Zambrano. II. Título.

CDU 606:687

AGRADECIMENTO

O desenvolvimento desta pesquisa é fruto da colaboração de várias pessoas e instituições ao quais gostaria de expressar minha profunda gratidão.

Agradeço primeiramente a Deus, por ter atribuído a mim, oportunidade e capacidade de desenvolver este projeto de pesquisa.

Agradeço aos meus pais, Mac e Vanuza por todo apoio, incentivo, encorajamento e luz que me proporcionaram diante dos obstáculos enfrentados. Agradeço pela paciência, compreensão, por se dedicarem a cuidar de mim e me moldarem com sua sabedoria, valores e amor.

Agradeço a meu orientador, professor Dr. Michel, por dividir comigo seu conhecimento, confiar no meu potencial, pela dedicação às atribuições como orientador, por promover um ambiente de pesquisa acessível e acolhedor, e pela amizade construída durante toda realização deste projeto.

Agradeço a professora Dr^a. Elisa do Instituto Nacional de Medicina Tropical (INMeT), por sua grande contribuição a esta pesquisa, pelo tempo dedicado e aprendizado compartilhado.

Agradeço a Dr^a. Valeria Maia Merzel do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), pelo acolhimento e colaboração no desenvolvimento do projeto. Agradeço a Viviane Piccin, por ter se dedicado a me acompanhar durante todos os procedimentos realizados no CPQBA e ter compartilhado seu conhecimento e amizade.

Por fim, agradeço ao apoio financeiro concedido pela Universidade Federal da Interação Latino-Americana – UNILA e aos colaboradores do Laboratório de Biotecnologia Ambiental da UNILA.

Partilho a conquista desta titulação com todos vocês!

Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.

Albert Einstein

BERNAL, S. P. F.; **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS E FUNGOS ISOLADOS DE UMA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE INDÚSTRIA TÊXTIL**. 124 páginas. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biociências – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

RESUMO

Os micro-organismos representam uma das fontes mais abundantes para obtenção de produtos naturais biologicamente ativos que podem ser aplicados nas mais diversas necessidades cotidianas. A alta flexibilidade, facilidade de cultivo e replicabilidade de bactérias e fungos são alguns dos fatores que tornam esses organismos imprescindíveis em diversos setores da indústria e também na busca por compostos medicinais que possam conter diferentes patologias. Os ambientes aquáticos são responsáveis por agregar uma alta variedade de comunidades microbianas e as indústrias que utilizam de recursos hídricos, quando presentes, tendem a influenciar diretamente no ciclo de vida desses organismos, especialmente quando há despejo de poluentes. A formação desse ambiente complexo favorece o crescimento e prevalência de linhagens microbianas mais adaptadas, capazes de produzir metabólitos secundários para sua sobrevivência. A indústria têxtil é uma grande representante da utilização de água para seus processamentos e normalmente tende a possuir efluentes tóxicos com alta concentração de corantes, metais pesados e temperatura elevada. Com esta perspectiva, o presente projeto buscou analisar 105 micro-organismos, entre bactérias e fungos isolados de uma estação de tratamento de indústria têxtil quanto a sua capacidade de produção de enzimas para aplicações industriais como a celulase, enzimas com potencial aplicação na área médica como a lacase e as proteases (gelatinase e collagenase) e metabólitos com ação antimicrobiana. Os testes de triagem em placas foram realizados para produção das enzimas de interesse, celulase em meio com CMC, lacase em meio com guaiacol e protease em meio ágar-leite. Os testes de atividade enzimática de celulase foram feitos com Azo-CMcelulose, para lacase foi utilizado ABTS e para os testes de proteases foi utilizado Azo-caseína, bem como ensaios do perfil proteico, zimografia e atividade gelatinolítica e collagenolítica. Os testes de antimicrobianos foram realizados por técnicas de difusão em discos com extrato microbiano e a atividade mínima inibitória também foi testada. Os isolados de interesse biotecnológico foram caracterizados por métodos morfológicos e moleculares (Taxonomia Polifásica). Os resultados demonstraram atividades enzimáticas dos fungos e algumas bactérias, onde o isolado ITF10 *Aspergillus sydowii* apresentou 0,0275 U L⁻¹ de atividade enzimática de lacase. A melhor produção de celulase foi 50,6927 U ml⁻¹ pelo isolado ITF47 *Aspergillus amoenus*. A atividade mais alta de protease extracelular foi pela bactéria ITB47 *Bacillus* sp. (9,466 U/enz mg e intracelular 7,000 U/enz) pelo isolado ITF14 *Penicillium* sp. Foi observado a produção de uma enzima com atividade gelatinolítica do fungo ITF33 *Sarocladium* sp, a qual foi caracterizada com peso de 45 kDa-MM. Para o mesmo fungo, a atividade collagenolítica foi demonstrada em 9,04 U / mg. No teste de MIC a menor concentração encontrada foi 0,03125mg (ITF30 *Aspergillus sydowii*), capaz de inibir o crescimento da *E.coli* e os isolados ITF13, ITF30 e ITF47 foram capazes de inibir todas as bactérias patogênicas testadas. Foram identificados 9 micro-organismos por sequenciamento molecular e outros 17 por morfologia microscópica. A pesquisa de micro-organismos recuperados de fontes diferenciadas, como de efluente da indústria têxtil, se mostrou promissora, tendo em vista a identificação de células produtoras de compostos de interesse com alta aplicabilidade na área industrial e médica.

Palavras-chave: Lacase. Celulase. Gelatinase. Collagenase. Metabólitos secundários.

BERNAL, S. P. F.; **EVALUATION OF THE BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF BACTERIA AND FUNGI ISOLATED FROM TEXTILE INDUSTRY TREATMENT PLANT**. 124 pages. Master's thesis of the Post-Graduate Program in Biosciences – Federal University of Latin American Integration, Foz do Iguaçu, 2020.

ABSTRACT

Microorganisms represent one of the most abundant sources for obtaining biologically active natural products that can be applied to the most diverse daily needs. The high flexibility, easy cultivation and replicability of bacteria and fungi are some of the factors that make these cells indispensable in different sectors of the industry and also in the search for medicinal compounds that may contain different pathologies. Aquatic environments are responsible for aggregating a high variety of microbial communities and industries that use water resources, when present, tend to directly influence the life cycle of these organisms, especially when pollutants are dumped. The formation of this complex environment favors the growth and prevalence of more adapted microbial strains, capable of producing secondary metabolites for their survival. The Textile industry is a major representative of the use of water for its processing and usually tends to have toxic effluents with a high demand for dyes, heavy metals and high temperatures. In this sense, the present work aimed to analyze 105 microorganisms, including bacteria and fungi isolated from a textile industry treatment plant, regarding their capacity to produce enzymes for industrial applications such as cellulase, enzymes with potential application in the medical field as laccase and proteases (gelatinase and collagenase) and metabolites with antimicrobial action. Plates screening tests were performed to produce the enzymes of interest, cellulase in CMC media, laccase in guaiacol and protease in milk agar. The cellulose, laccase, protease and collagenase enzyme activity assay were performed by using Azo-CMcellulose, ABTS, Azo-casein and azocolagen, respectively. The proteic profile and gelatinolytic activity were performed by zymography. Antimicrobial tests were performed using diffusion techniques on disks with microbial extract and the minimum inhibitory activity was also tested. The isolates of biotechnological interest were characterized by morphological and molecular methods (Polyphasic Taxonomy). The results showed good enzymatic activities by fungi and some bacteria. The isolate ITF10 *Aspergillus sydowii* showed 0.0275 U L⁻¹ of laccase enzymatic activity. The best cellulase production was 50.6927 U ml⁻¹, by the isolate ITF47 *Aspergillus amoenus*. The highest activity of extracellular protease was by the bacteria ITB47 *Bacillus* sp. (9,466 U / enz mg) and intracellular (7,000 U / enz) by the isolate ITF14 *Penicillium* sp. The production of an enzyme with gelatinolytic activity of the fungus ITF33 *Sarocladium* sp was observed, which was characterized with a weight of 45 kDa-MM. For the same fungus, collagenolytic activity was demonstrated at 9,04 U / mg. In the MIC test, the lowest concentration found was 0.03125mg (ITF30 *Aspergillus sydowii*), capable of inhibiting the growth of *E.coli* and the isolates ITF13, ITF30 and ITF47 were able to inhibit all pathogenic bacteria tested. Nine microorganisms were identified by molecular sequencing and another 17 by microscopic morphology. The search for microorganisms recovered from different sources, such as effluent from the textile industry, has shown promise, in view of the identification of cells that produce compounds of biotechnological interest with high applicability in the industrial and medical fields

Key words: Lacase. Cellulase. Gelatinase. Collagenase. Secondary metabolites.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 01 | Principais poluentes descarregados em cada etapa do processamento úmido têxtil..... | 18 |
| Figura 02 | Fluxograma da estação de tratamento de águas residuais..... | 19 |
| Figura 03 | Aplicações de enzimas de fontes microbianas..... | 23 |
| Figura 04 | Mecanismo de reação geral de lacases | 26 |
| Figura 05 | Representação esquemática da estrutura química e das ligações intra- e inter-moleculares de hidrogênio na celulose | 28 |
| Figura 06 | Visão geral de um processo de conversão bioquímica convencional para produzir combustíveis e produtos químicos a partir de biomassa lignocelulósica | 32 |
| Figura 07 | Clivagens em diferentes sítios de ligação realizada por proteases | 33 |
| Figura 08 | Classificação das Proteases | 34 |
| Figura 09 | Isolados microbianos com atividade em placa contendo guaiacol..... | 59 |
| Figura 10 | Isolado <i>Bacillus</i> sp. (ITB24) apresentando descoloração em CMC..... | 60 |
| Figura 11 | Halos fúngicos de diferentes tamanhos em meios com CMC | 61 |
| Figura 12 | Atividade de lacase e celulase dos isolados microbianos..... | 63 |
| Figura 13 | Halos acentuados e maiores (+++) de produção de proteases..... | 68 |
| Figura 14 | Atividade azocaseinolítica específica dos fungos..... | 70 |
| Figura 15 | Atividade azocaseinolítica específica das bactérias | 73 |
| Figura 16 | Perfil proteico dos isolados produtores de proteases | 75 |
| Figura 17 | Atividade gelatinolítica dos isolados produtores de protease | 77 |
| Figura 18 | Formação de halos de inibição da <i>Escherichia coli</i> ao redor do disco com extrato das bactérias ITB25; 26; 27; 29 e 31..... | 81 |
| Figura 19 | Resultados do teste de MIC contra a bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 82 |
| Figura 20 | Macro e Microscopia das bactérias de indústria têxtil..... | 87 |
| Figura 21 | Isolados microbianos de interesse biotecnológico identificados..... | 89 |
| Figura 22 | Arvore filogenética dos isolados ITF4; 10; 22; 27; 30 e 47..... | 94 |

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 23 | Arvore filogenética dos isolados ITF29 e 33 | 95 |
| Figura 24 | Arvore filogenética da bactéria ITB47 | 96 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Micro-organismos produtores de celulase..... | 30 |
| Tabela 2 – Exemplos de fontes de isolamento de micro-organismos produtores de protease | 36 |
| Tabela 3 – Mínima Concentração Inibitória dos extratos de fungos e bactérias em mg mL ⁻¹ | 83 |
| Tabela 4 – Características morfológicas microscópica e macroscópicas dos fungos..... | 88 |
| Tabela 5 – Identificação molecular dos isolados microbianos de interesse biotecnológico | 93 |
| Tabela 6 – Resultados obtidos pelos isolados de indústria têxtil | 98 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------|---|
| ABTS | 2,2 azino-bis etilbentiazoline |
| CMC | Carboximetilcelulose |
| CPQBA | Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas |
| DBO | Demanda biológica de oxigênio |
| DQO | Demanda química de oxigênio |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| FDA | Food and Drug Administration |
| INMeT | Instituto Nacional de Medicina Tropical |
| ITF | Fungo de indústria têxtil |
| ITB | Bactéria de indústria têxtil |
| ITS | Internal Transcribed Spacer |
| MDRSA | <i>Staphylococcus aureus</i> multirresistente |
| MH | Muller Hinton |
| MIC | Concentração Mínima Inibitória |
| MMP | metaloproteinases |
| NA | Nutriente Agar |
| NB | Líquido nutriente |
| NJ | Neighbor-joining |
| UNILA | Universidade Federal da Integração Latino-Americana |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PDA | Potato Dextrose Agar |
| PDB | Líquido Potato Dextrose |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| TTC | Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio |
| VRE | <i>Enterococcus faecalis</i> resistente à vancomicina |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 Referencial teórico | 17 |
| 1.1.1 O efluente de indústria têxtil | 17 |
| 1.1.2 Biotecnologia e bioprospecção microbiana | 20 |
| 1.1.3 Enzimas microbianas de interesse biotecnológico | 22 |
| 1.1.3.1 Lacases | 25 |
| 1.1.3.2 Celulase | 28 |
| 1.1.3.3 Protease | 32 |
| 1.1.3.3.1 Colagenase..... | 37 |
| 1.1.3.3.2 Gelatinase..... | 39 |
| 1.1.4 Metabólitos microbianos com potencial antimicrobiano | 40 |
| 2 OBJETIVOS | 44 |
| 2.1 Objetivo geral | 44 |
| 2.2 Objetivos específicos | 44 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 45 |
| 3.1 Reativação e preparo das células microbianas | 45 |
| 3.2 Preparação dos extratos enzimáticos (Crescimento microbiano em meio líquido)..... | 45 |
| 3.3 Produção de Lacase | 46 |
| 3.3.1 Triagem em placas com Guaiacol | 46 |
| 3.3.2 Quantificação da produção de lacase com ABTS | 46 |
| 3.4 Produção de celulase | 48 |
| 3.4.1 Triagem inicial com corante Vermelho Congo | 48 |
| 3.4. 2 Quantificação da produção de celulase com o kit Azo-CMCellulase | 49 |
| 3.5 Produção de protease | 49 |
| 3.5.1 Triagem inicial em placas com leite | 49 |
| 3.5.2 Extração de proteínas intracelulares..... | 50 |
| 3.5.3 Quantificação da produção de protease com Azo-caseína | 50 |
| 3.5.4. Determinação da concentração de proteínas | 51 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5.5 Perfil proteico | 51 |
| 3.5.6 Atividade gelatinolítica | 51 |
| 3.5.7 Atividade colagenolítica | 52 |
| 3.6. Atividade antimicrobiana | 53 |
| 3.6.1 Teste por difusão em ágar: técnica do disco | 53 |
| 3.6.2 Teste de Concentração Mínima Inibitória (MIC) | 53 |
| 3.7 Taxonomia Polifásica dos isolados de interesse biotecnológico | 54 |
| 3.7.1 Caracterização morfológica | 54 |
| 3.7.2 Caracterização Molecular | 55 |
| 3.7.2.1 Extração de DNA genômico | 55 |
| 3.7.2.2 Reação de PCR e purificação dos <i>amplicons</i> | 56 |
| 3.7.3 Sequenciamento e análises filogenéticas | 56 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 58 |
| 4.1 Reativação das células microbianas utilizadas no estudo | 58 |
| 4.2 Atividade enzimática | 58 |
| 4.2.1 Triagem para produção de lacase e celulase | 58 |
| 4.2.2 Atividade enzimática de Lacase e Celulase | 63 |
| 4.2.3 Triagem para atividade proteolítica | 68 |
| 4.2.4 Atividade azocaseinolítica específica | 70 |
| 4.2.5 Perfil proteico dos micro-organismos produtores de protease | 74 |
| 4.2.6 Atividade Gelatinolítica | 76 |
| 4.2.7 Atividade colagenolítica | 79 |
| 4.3 Produção de metabólitos antimicrobianos | 80 |
| 4.3.1 Atividade antimicrobiana por técnica de disco | 80 |
| 4.3.2 Concentração Mínima Inibitória (MIC) | 82 |
| 4.4 Taxonomia polifásica | 87 |
| 4.4.1 Caracterização morfológica (Macroscópica e Microscópica)..... | 87 |
| 4.4.2 Caracterização Molecular | 93 |
| 4.5 Potencial biotecnológico de fungos e bactérias isolados de indústria têxtil..... | 97 |

| | |
|--|------------|
| 5 CONCLUSÃO | 102 |
| 6 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO | 104 |

1 INTRODUÇÃO

Produtos naturais derivados de micro-organismos são amplamente utilizados na indústria, na medicina e também na agricultura. Através da bioprospecção, podemos obter bactérias e fungos de ecossistemas complexos com características diferenciadas capazes de solucionar desafios que constantemente aparecem no cotidiano (NOVAKOVA & FARKASOVSKY, 2013).

A humanidade conseguiu explorar apenas uma pequena parcela da população microbiana disponível para o seu próprio benefício (SINGH *et al*, 2018). A investigação desse tipo de recurso é essencial para o entendimento de suas características e, pode-se considerar que, existem muitos benefícios científicos esperados com esse tipo de pesquisa (HASEENA *et al*, 2017).

Os micro-organismos são ótimos agentes produtores de enzimas e metabólitos secundários e a seleção correta desses agentes produtores é um fator chave para sua produção em larga escala (GAUTAM & AZMI, 2017). Algumas enzimas de fontes microbianas foram descobertas no século 20 e desde então, estudos sobre seu isolamento, caracterização de propriedades, produção em escala industrial e sua aplicação na bioindústria, progrediram continuamente e o conhecimento sobre elas continua a ser atualizado regularmente (NIGAM, 2013).

A necessidade da inovação de compostos úteis para fornecer assistência á humanidade sempre foi crescente. Os micro-organismos têm sido utilizados há milênios na produção de cerveja, vinho, vinagre, iogurte e queijo, mas o número de aplicações possíveis continua a crescer também em outros setores indústrias, como é o caso da indústria de panificação, do couro, indústria de papel e indústria têxtil (ACHARYA & CHAUDHARY, 2012). Hoje sabe-se que além de todas essas aplicações os micro-organismos são fornecedores da grande maioria de medicamentos em uso atualmente 45% são produzidos por actinomicetos, 38% por fungos e 17% por outras fontes bacterianas (LIU *et al*, 2010).

Muitos dos patógenos envolvidos em doenças infecciosas estão rapidamente desenvolvendo resistência aos antibióticos disponíveis no mercado, o que dificulta o tratamento e torna de extrema importância a busca por novos mecanismos capazes de controlar essa situação (WHO, 2017). Os antibióticos são amplamente distribuídos na

natureza, onde desempenham um papel importante na regulação da população microbiana dos ecossistemas (SETHI *et al*, 2013).

Embora a tecnologia tenha avançado e proporcionado muitos novos caminhos, existe um consenso geral de que a diversidade química oferecida por produtos não naturais ou fruto de recombinações genéticas não são mais completamente suficientes para proporcionar novas grandes descobertas farmacológicas relevantes. Isso levou muitos pesquisadores a retornarem as pesquisas de triagens de produtos naturais, voltando suas atenções para ambientes antes pouco explorados (MONCIARDINI *et al*, 2014).

As comunidades microbianas podem adquirir tolerância em ambientes poluídos como resultado de uma adaptação ou aclimatação de populações. Essas mudanças na composição das espécies habitantes pode ser resultado das interações competitivas alteradas durante a exposição a agentes tóxicos, que pode acontecer naturalmente em efluentes onde há despejo de materiais (MENZ *et al*, 2017). Neste contexto, a produção de enzimas e agentes antimicrobianos por bactérias e fungos pertencentes a esses habitats são de particular interesse, já que serão produzidos devido a influências diferenciadas do próprio meio ao qual pertencem (SAARENHEIMO *et al*, 2017).

Com esta perspectiva, o presente projeto teve como objetivo avaliar a produção de compostos biotecnológicos de interesse industrial, como a celulase bem como compostos potencialmente utilizados na área da saúde como as enzimas lacase, gelatinase e colagenase, e metabólitos secundários com ação antimicrobiana por fungos filamentosos e bactérias recuperadas de uma amostra de estação de tratamento industrial têxtil. Os microorganismos provenientes desse tipo de ambiente podem conter características diferenciais moldadas pela própria interação atípica entre as comunidades microbianas, gerando metabólitos com possíveis aplicações tanto no setor industrial quanto na área de saúde e bem-estar social.

O desenvolvimento desta pesquisa contou com a colaboração da professora Dr^a. Maria Elisa Peichoto do Instituto Nacional de Medicina Tropical (INMeT) e da Dr^a. Valeria Maia Merzel do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) – Unicamp.

A pesquisa desenvolvida teve apoio financeiro através de bolsa de demanda social fornecida pela Universidade Federal da Integração Latino-Americana – Unila.

1.1 Referencial teórico

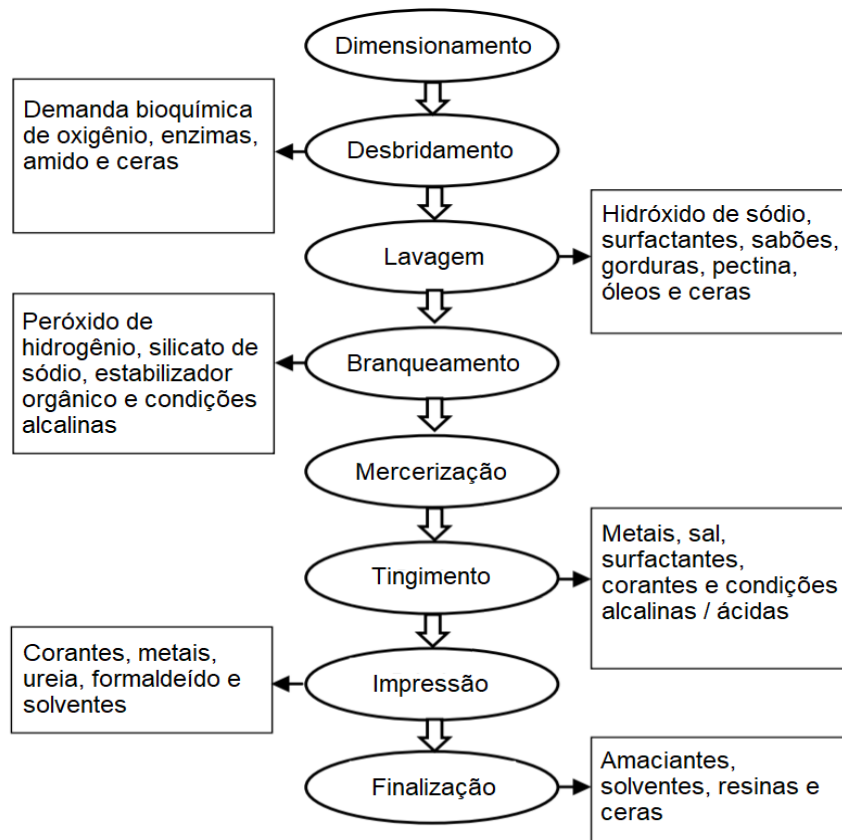
1.1.1 O efluente de indústria têxtil

O crescimento populacional e a industrialização pressionaram significativamente os ecossistemas globais. A contaminação e degradação dos ecossistemas por poluentes industriais é um problema emergente no século XXI (AHMAD *et al*, 2018). Alguns setores industriais costumam gerar grandes volumes de resíduos ricos em compostos quimicamente tóxicos no estado gasoso, líquido e até sólidos com elevado tempo de decomposição. O ramo da indústria têxtil utiliza de grandes volumes de água e contribui no processo de poluição quando seus efluentes não são tratados adequadamente. A poluição pode se espalhar por longos quilômetros em rios, alterando o ecossistema aquático de diversas formas (LELLIS *et al*, 2019).

O processamento têxtil para obtenção e preparo de tecidos representa um dos maiores e mais complexos ramos industriais. Para elaboração dos tecidos são utilizadas fibras vegetais como algodão, fibras animais como lã, seda e vários polímeros sintéticos como nylon, poliéster e acrílicos (OKE, 2018). A preparação desses materiais requer etapas de processamento mecânico a seco, tais como fiação, tricô, tecelagem, produção de vestuário e também processos como dimensionamento, limpeza, branqueamento, mercerização, tingimento, impressão e acabamento, os quais necessitam diretamente da utilização de grandes volumes de água provenientes, na maioria das vezes, de rios ou lagos. A quantidade de água consumida por vários tipos de tecidos varia de indústria para indústria, dependendo do processo de tingimento e do tipo de tecido produzido, mas estima-se que são necessários em torno de 200 L de água para produzir 1 Kg de tecido (KHAN *et al*, 2009).

Os efluentes da indústria têxtil costumam apresentar elevada quantidade de poluentes químicos nocivos à saúde humana, além da capacidade de gerar grandes impactos ambientais prejudicando diretamente animais, plantas e outros diversos organismos que vivem nesse ecossistema (ZHEZHOVA *et al*, 2014). Esses poluentes normalmente incluem sólidos suspensos e dissolvidos, demanda biológica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), produtos químicos, corantes de diversas tonalidades e toxicidades, metais como cobre, arsênio e zinco. A Figura 1 mostra os processos de elaboração dos tecidos e os agentes com potencial poluidor que são utilizados em cada etapa (HOLKAR *et al*, 2016).

Figura 1 – Principais poluentes descarregados de cada etapa do processamento úmido têxtil.



Fonte: Figura adaptada de HOLKAR *et al*, 2016.

Os valores da DBO encontrados no efluente têxtil podem ser associados a processos de lavagem com detergentes ou outros compostos orgânicos biodegradáveis dessa etapa. Já os valores da DOQ indicam a incorporação dos corantes e demais aditivos poluentes ao efluente, além de indicar a presença de substâncias capazes de consumir oxigênio como o Ferro (Fe^{2+}), Magnésio (Mg^{2+}), Amônia (NH_4^+) e elevados teores de cloretos. Esses parâmetros, em conjunto, podem ser muito úteis para indicar a biodegradabilidade de um efluente ou despejo industrial. Quanto mais próximos forem os valores de DBO e DQO, maior é a biodegradabilidade do despejo, ou seja, com mais facilidade os micro-organismos presentes no ambiente irão degradar naturalmente os compostos presentes na água (LOPES *et al*, 2017).

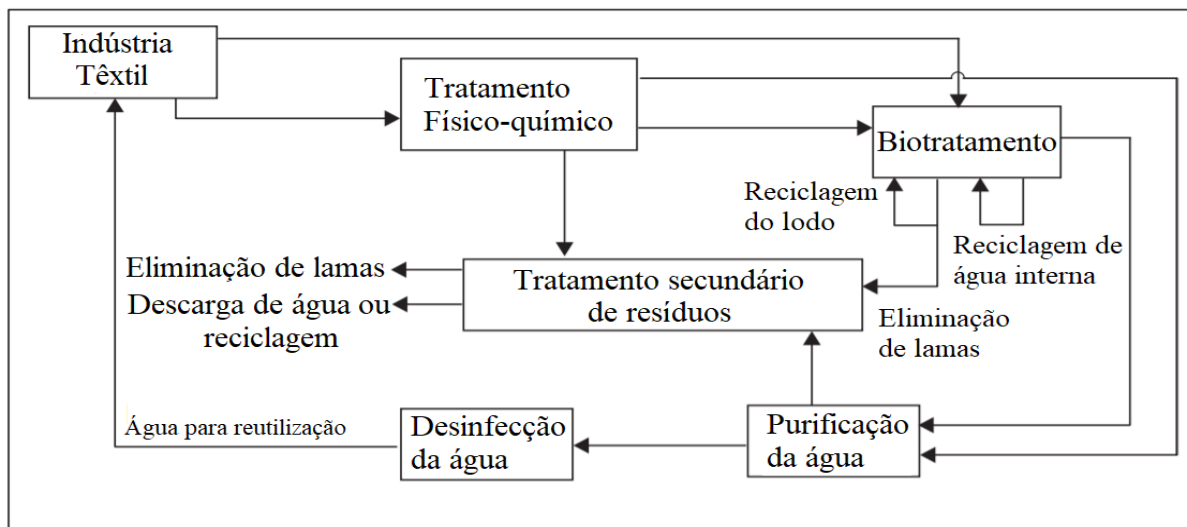
Os corantes utilizados nos processos têxteis, quando descarregados em efluentes, afetam severamente a função fotossintética das plantas devido à baixa penetração de luz e a alta DBO, que pode ocasionar um rápido esgotamento do oxigênio dissolvido. As

partículas suspensas podem sufocar brânquias de peixes levando-os a morte e diminuem a capacidade das algas em produzir nutrientes e oxigênio. Para evitar todos esses efeitos nocivos ao meio ambiente, as águas residuais da indústria têxtil precisam ser tratadas e descartadas de acordo com os padrões estabelecidos pelas leis regentes (PRABHA, 2011).

Com o passar dos anos, os impactos ambientais do efluente têxtil gerou uma grande preocupação sobre a efetividade nos tratamentos das águas despejadas. Atualmente, existem diversos tratamentos disponíveis para remoção dos poluentes, incluindo processos de tratamento físico, químico, bioquímico e híbrido, dependendo do tipo e quantidade de carga poluente, para tratá-lo de maneira econômica e eficiente (HOLKAR *et al*, 2016).

O tratamento físico-químico e o biotratamento são os principais processos para a remoção de poluentes em águas residuais. A água tratada é então purificada e desinfetada antes de ser reutilizada no processo de fabricação ou descartada nos efluentes, como representado na Figura 2 (FUNG & WIBOWO, 2013).

Figura 2 – Fluxograma da estação de tratamento de águas residuais



Fonte: FUNG & WIBOWO, 2013.

O tratamento de águas residuais abrange processos que convertem água contaminada em um estado suficientemente limpo que pode ser descarregado no efluente com um impacto ambiental adverso mínimo (KIM *et al*, 2019) Apesar da importância econômica e ambiental, o entendimento das comunidades microbianas presentes nas estações de tratamento

de águas residuais permanece limitado, principalmente nos países em desenvolvimento (SILVA-BEDOYA *et al*, 2016).

As estações de tratamento de águas residuais são importantes fontes de nutrientes, especialmente nitrogênio e material orgânico, alterando os processos biogeoquímicos nos ecossistemas. Dependendo do tipo de resíduo industrial descartado, este pode modificar a função e a composição das comunidades microbianas presentes alterando as características físico-químicas do habitat (SAARENHEIMO *et al*, 2017).

Esse tipo de alteração ambiental pode reduzir o tamanho e a diversidade da população microbiana, favorecendo certos grupos funcionais e podendo até mesmo levar à uma homogeneização biótica. Além desses fatores, a própria descarga de poluentes pode trazer novos micro-organismos capazes de mudar a composição e a função da comunidade (CHAHINIAN *et al*, 2012).

O conhecimento fundamental sobre a estrutura microbiana do tratamento de efluentes é essencial para a compreensão e melhoria do processo e operação dos sistemas que utilizam tratamento biológico, além de representar uma alternativa na busca de micro-organismos com características diferenciadas na produção de compostos de interesse biotecnológico (ANTUNES *et al*, 2019).

1.1.2 Biotecnologia e bioprospecção microbiana

Desde os tempos antigos, os humanos usavam sua natureza circundante como fonte de alimento, remédios, energia e outros produtos valiosos (MATUSZEWSKA, 2016). Apenas algumas décadas atrás, a biotecnologia passou a ser considerada um ramo de alta complexidade tecnológica, lidando com a manipulação de genes e o desenvolvimento de organismos com novas formas e funções. No entanto, com o rápido progresso e expansão da pesquisa, houve uma mudança de conceito nesse tema (PUSHPANGADAN *et al*, 2018). A pesquisa biotecnológica tem desempenhado um papel significativo na conversão de recursos da biodiversidade em produtos e processos com valor industrial e comercial, aumentando a produtividade e a aplicação em muitas áreas cruciais (DIMASIA & GRABOWSKI, 2007).

Pode-se dizer que a biotecnologia é uma referência ampla a um grupo diversificado de tratamentos, produtos biológicos, diagnósticos, dispositivos médicos, testes laboratoriais clínicos, aplicações agrícolas, industriais e de biocombustíveis. A indústria biotecnológica abrange setores diversos que estão em constante expansão à medida que novas descobertas científicas são apresentadas e novas aplicações são encontradas. O objetivo da biotecnologia é elaborar produtos e processos únicos que melhorem a vida, a saúde e o bem-estar dos indivíduos e da sociedade como um todo (SHIMASAKI, 2014).

O segmento que caminha em conjunto com a biotecnologia é a bioprospecção, que engloba a exploração da biodiversidade em busca de novos recursos de valor social e econômico (BEATTIE *et al*, 2011). A diversidade existente de micro-organismos pode atuar como um reservatório de recursos a partir do qual espécies individuais com características especiais podem ser exploradas (ACHARYA & CHAUDHARY, 2012). Essa atividade tem se mostrado poderosa para o entendimento de diversas questões biológicas da atualidade. Através de sua prática é possível alcançar organismos diferenciados de diversos tipos de ambientes e através da biotecnologia, pode-se desenvolver produtos de alta aplicabilidade para o bem-estar da humanidade (HAZRA & UPADHYAY, 2018).

Os micro-organismos representam os principais motores de ciclagem elementar no planeta e, portanto, têm um profundo impacto em substratos orgânicos e minerais (JUNIER & JOSEPH, 2017). Sua versatilidade metabólica garante que eles participem de papéis cruciais em processos biogeoquímicos como no ciclo do carbono, do nitrogênio e do enxofre e são importantes produtores e decompositores nas cadeias alimentares. O funcionamento da biosfera depende diretamente de atividades microbianas e apesar disso, muitas informações ainda não são conhecidas sobre suas funções (NARDINI *et al*, 2010).

As atividades microbianas são consideradas onipotentes na natureza e sua existência é provada em praticamente todos os lugares onde já foram buscados. Os micro-organismos estão presentes no solo, na água, no ar, nos alimentos, nos órgãos dos animais e outros sistemas diversificados. Até mesmo em ambientes de temperaturas e condições nutricionais extremas, como nas rochas, nas geleiras e em fontes termais os micro-organismos podem ser encontrados, trabalhando na utilização dos recursos disponíveis em cada situação (RODRÍGUEZ-ROJAS *et al*, 2013).

Bactérias e fungos frequentemente compartilham micro habitats, onde se reúnem em comunidades dinâmicas para co-evoluírem (DEVEAU *et al*, 2018). Fungos trabalham em associações simbióticas com diversos grupos de organismos para manter seus respectivos equilíbrios naturais, como os endofíticos em quase todas as espécies de plantas. As bactérias também costumam viver em associações com os fungos e outros organismos. Estas possuem vantagem ecológica na associação com as plantas já que algumas delas, principalmente do gênero *Rhizobium*, possuem capacidade de fixação do nitrogênio (BLACKWELL & VEGA, 2018).

Estudos demonstram que quando uma comunidade microbiana é exposta a algum tipo de estresse ambiental, a escassez de fontes de obtenção de energia pode prejudicar o crescimento de algumas espécies e favorecer o aumento da produção de enzimas e metabólitos secundários de outros grupos mais seletos, considerados resistentes, que prevalecem no ambiente diferenciado (DEMAIN, 2000). Estudos sobre a ecologia de micro-organismos do solo sugerem fortemente que os antibióticos geralmente são secretados em concentrações sub-letais e, portanto, são importantes para a comunicação interespecífica quanto para a inibição competitiva, fornecendo informações poderosas nos estudos de combate à resistência aos medicamentos (MLOT, 2009).

A descoberta e identificação de novos biocatalisadores também é um objetivo importante na pesquisa biotecnológica (SPEDA *et al*, 2017). Os micro-organismos são importantes para os processos de produção enzimática, devido à sua alta capacidade de produção, baixo custo e facilidade de manipulação genética. Existe um forte interesse biotecnológico em enzimas microbianas em vários campos, incluindo processamento de alimentos, fabricação de detergentes e têxteis, pesquisa agrícola e farmacêutica, terapia médica e biologia molecular (CASTRO *et al*, 2014).

1.1.3 Enzimas microbianas de interesse biotecnológico

A indústria de biotecnologia está se expandindo em todo o mundo e no contexto atual, a produção de enzimas possibilitou grandes benefícios econômicos. Em escala global, o mercado de enzimas arrecada bilhões de dólares anualmente, e o trabalho de

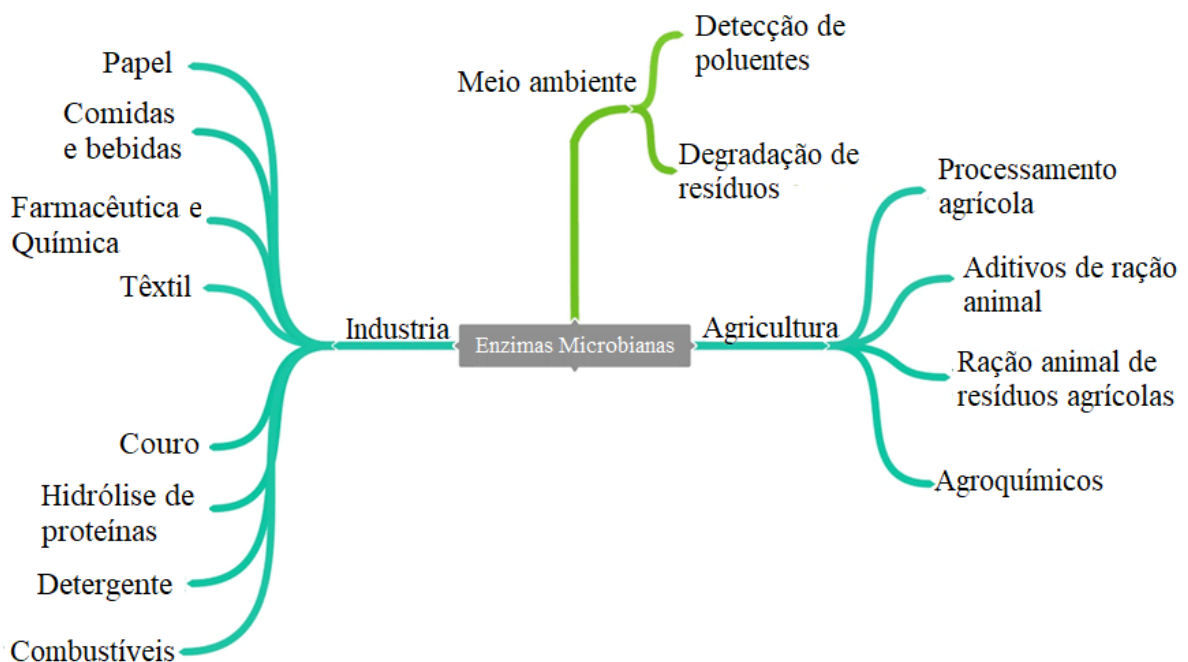
pesquisa na área se beneficia de um número crescente de patentes e artigos científicos publicados (SILVA, 2017).

As enzimas são conhecidas por desempenharem o papel de biocatalisadoras, agindo em todos os estágios do metabolismo e das reações químicas que tornam possível a vida dos organismos (NIGAM, 2013). Atualmente, aproximadamente 200 tipos de enzimas microbianas são utilizados comercialmente nas mais diversas aplicações. No entanto, apenas cerca de 20 enzimas são produzidas em uma escala industrial (LIU & KOKARE, 2017).

Micro-organismos representam fontes atraentes de enzimas, pois podem ser cultivados em grandes quantidades em um período de tempo relativamente curto e, como tal, podem produzir um suprimento abundante e regular os produtos enzimáticos desejados. As enzimas microbianas costumam ser mais estáveis do que as obtidas de outras fontes naturais, além de geralmente poderem ser armazenadas em condições abaixo do ideal por semanas sem perda significativa de atividade biológica (ACHARYA & CHAUDHARY, 2012).

O papel desempenhado pela enzima na indústria engloba etapas na produção de alimentos e bebidas, materiais de limpeza, roupas, papel, combustíveis, medicamentos e produtos com finalidade diagnóstica na área médica (GURUNG *et al*, 2013). A Figura 3 apresenta algumas das principais aplicações das enzimas microbianas.

Figura 3 – Aplicações de enzimas de fontes microbianas.



Fonte: Adaptado de VITTALADEVARAM, 2017.

O uso biotecnológico de bactérias para obter produtos de interesse econômico, em particular enzimas, tem sido explorado durante várias décadas. A maioria das proteases comerciais são biosintetizadas por bactérias como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* e *Clostridium*, além de alguns fungos que também são relatados em produzir estas enzimas (SILVA, 2017). As xilanases com aplicações industriais são produzidas em quantidades significativas por espécies fúngicas pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Dentre as enzimas produzidas ainda podemos citar as lacases, celulases e amilases de fontes microbianas que são empregadas em vários setores industriais (ANBU *et al*, 2013).

Micro-organismos, como bactérias e fungos, produzem extracelularmente ou intracelularmente enzimas versáteis e atraentes comercialmente, com uma grande variedade de estruturas. Muitas enzimas microbianas, como amilases, proteases, pectinases, lipases, xilanases, celulases e lacases, são produzidas extracelularmente e algumas enzimas como a catalase de *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger* são enzimas intracelulares (LIU & KOKARE, 2017).

Na indústria da saúde, as enzimas são comumente utilizadas para compensar deficiências enzimáticas causadas por algumas patologias. Além disso, as enzimas também vêm sendo aplicadas no desenvolvimento e fornecimento de combustíveis alternativos para superar as questões associadas ao esgotamento dos recursos naturais e no desenvolvimento do ambiente sustentável (SINGH *et al*, 2017).

Quando comparadas às enzimas provenientes de fontes animais e vegetais, as enzimas microbianas apresentam diversas vantagens, como por exemplo, maior atividade e estabilidade. Outro aspecto interessante é que as enzimas produzidas por micro-organismos têm alto rendimento e são fáceis de serem modificadas para otimização do produto devido à diversidade bioquímica e à suscetibilidade à manipulação genética (GURUNG *et al*, 2013). Além de tudo isso, os micro-organismos ainda representam uma fonte extremamente rica para a descoberta desses compostos através de muitas tecnologias modernas, como triagem por metagenoma e exploração da diversidade de extremófilos (ADRIO & DEMAINE, 2014).

As interações de micro-organismos com outros micro-organismos e sistemas não microbianos pode levar a produção de enzimas e metabólitos, seja por uma interação simbiótica entre os organismos ou uma interação de competição, ao qual um micro-organismo irá produzir antimicrobianos capazes de inibir o crescimento de outro organismo (SHUKLA,

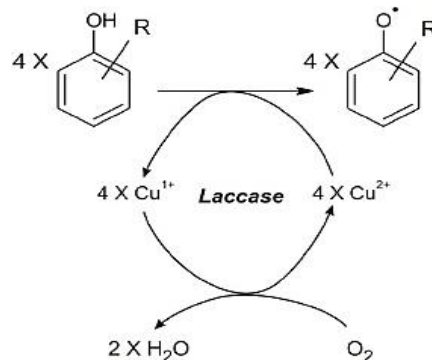
2015). A maioria dos micro-organismos é incapaz de crescer e produzir enzimas em ambientes agressivos e tóxicos a eles. No entanto, alguns micro-organismos passaram por várias adaptações, permitindo seu crescimento e produção de enzimas em condições adversas (ANBU *et al*, 2017). Recentemente, várias linhas de estudo foram desenvolvidas para isolar novas linhagens bacterianas e fúngicas de ambientes agressivos, com pH extremo, temperatura, salinidade, metais pesados e solvente orgânico para a produção de diferentes enzimas com propriedades ativas e diferenciadas (GOPINATH *et al*, 2013).

1.1.3.1 Lacases

A lacase é uma enzima oxidoreductase que age sobre compostos fenólicos e não-fenólicos, convertendo a molécula de oxigênio em água na redução concomitante de quatro elétrons. Os elétrons liberados são capazes de oxidar diversos compostos aromáticos e não aromáticos, aminas contendo anéis fenólicos e diversos grupos funcionais conjugados como metoxi amino, diamino e alguns poucos compostos metálicos (MARGOT *et al*, 2013).

Uma das principais características das lacases envolve sua grande eficiência em catalisar oxidações mono eletrônicas de um substrato redutor (normalmente compostos fenólicos) gerando espécies de radicais livres, através das propriedades redox dos átomos de cobre (ARREGUI *et al*, 2019). Os elétrons extraídos do substrato são armazenados em uma complexa estrutura do núcleo constituída por quatro átomos de cobre e finalmente transferidos para o oxigênio para produzir duas moléculas de água. Quatro oxidações mono eletrônicas são catalisadas a partir de um substrato fenólico, gerando os radicais livres correspondentes. Os elétrons são então transferidos e armazenados usando os quatro átomos de cobre dentro da proteína e finalmente transferidos para o oxigênio molecular para produzir duas moléculas de água (Figura 4) (ENGUIA, 2011).

Figura 4 – Mecanismo de reação geral de lacases.



Fonte: ENGUITA, 2011.

Toda essa estrutura de reação permite a lacase oxidar uma grande variedade de substratos sem produzir intermediários com peróxido de hidrogênio (ENGUITA, 2011). Cada molécula de lacase é capaz de extrair e armazenar quatro elétrons antes de transferi-los para o aceptor final, oxigênio molecular, em um mecanismo de alto rendimento (SHRADDHA *et al*, 2011). É difícil categorizar as lacases com base no substrato, devido à grande variedade de compostos que podem ser catabolizados. Essas enzimas têm a propriedade de alterar seu potencial redox, assim o tipo de substrato muda de uma lacase para outra (HOYOS *et al*, 2013).

As lacases de origem fúngica necessitam de um maior período de fermentação e algumas espécies não possuem um rendimento tão acentuado para sua inclusão na utilização industrial. As fontes bacterianas de lacase têm sido mais exploradas ao longo dos anos devido as suas características que possibilitam a utilização em uma maior faixa de temperatura e pH, com estabilidade melhor e maior produção de substrato em tempos relativamente menores, o que gera custos mais flexíveis à indústria (CHAUHAN *et al*, 2017).

Espécies de bactérias como *Streptomyces lavendulae*, *Streptomyces cyaneus* e *Marinomonas mediterranea* já foram descritas como produtoras de lacase. Alguns dos principais representantes fúngicos na produção da lacase são aqueles conhecidos por serem causadores da podridão branca na madeira em decomposição, como *Phlebia irradiam*, *Pleurotus ostreatus* e *Trametes versicolour* (SHRADDHA *et al*, 2011). Além deles, muitas espécies de *Trichoderma*, como *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma longibrachiatum*, também são conhecidos como produtores da enzima (HOLKER *et al*, 2002). *Pycnoporus cinnabarinus* produz lacase como enzima ligninolítica,

enquanto *Pycnoporus sanguineus* produz lacase como fenol oxidase (JIMENEZ-JUAREZ *et al*, 2005). Nas plantas, a lacase desempenha um papel nas lignificações, enquanto nos fungos está implicada na deslignificação, esporulação, produção de pigmentos, formação de corpos frutíferos e patogênese das plantas (SUMATHI *et al*, 2016).

As aplicações da lacase na indústria incluem diferentes setores, podendo ser utilizadas em diversos processos para bio-branqueamento na indústria da celulose e papel, descoloração e degradação de corantes têxteis em efluentes, clarificação de vinhos e chás e a produção de biossensores. A lacase também pode ser usada como ferramenta para diagnóstico médico e como agente de biorremediação para descontaminação de ambientes onde existem elevados índices de herbicidas e pesticidas (MISHRA & SRIVASTAVA, 2016).

Devido à especificidade e natureza biológica, as aplicações das lacases estão atraindo cada vez mais atenção. Essa enzima também pode ser utilizada na síntese de compostos médicos complexos como anestésicos, anti-inflamatórios, antibióticos, sedativos, incluindo triazol cicloalquila triazina, mitomicinas, dímero de penicilina X, cefalosporinas e vindolina dimerizada. A dermatite pela Hera venenosa (*Toxicodendron radicans*) é causada principalmente pelo urushiol, um óleo vegetal que contém a toxina derivada de catecol. A lacase oxida, desintoxica e polimeriza o urushiol, o que reduz o efeito da dermatite (CHEONG *et al*, 2010).

O sistema de tingimento capilar a base de lacase pode superar as desvantagens dos corantes químicos ao substituir o peróxido de hidrogênio como agente oxidante na fórmula, sendo menos irritante e mais fácil de manusear do que os corantes capilares usuais. As lacases também podem ser usadas como desodorantes em produtos de higiene pessoal, pasta de dente, enxaguantes bucais, detergente, sabão e fraldas (COUTO & HERRERA, 2006).

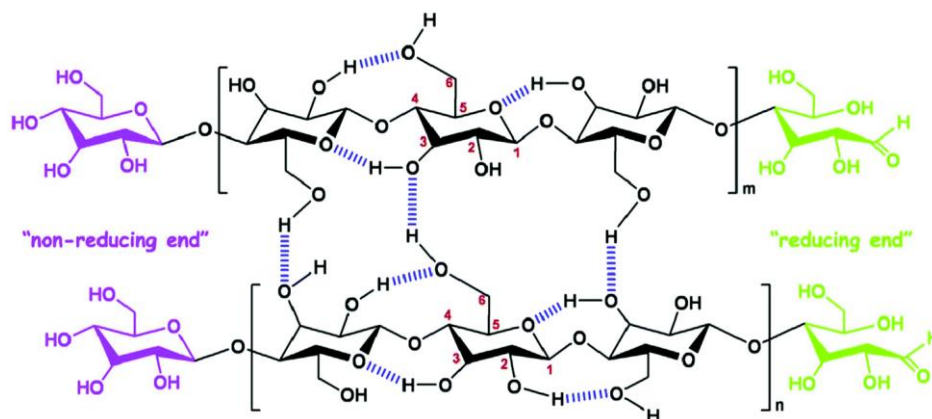
Também já foram relatadas atividades de lacase, isolada de *Pleurotus cornucopiae*, sobre a diminuição da transcriptase reversa em alguns tipos de vírus responsáveis por causar HIV. A inibição da entrada do vírus da hepatite C em células do sangue periférico e células de hepatoma também já foram descritas através da lacase purificada do cogumelo ostra (UPADHYAY *et al*, 2016).

1.1.3.2 Celulase

A celulose é a forma mais abundante de carbono fotossinteticamente fixado na biosfera. É um polímero fibroso de unidades de glicose que são interligadas por ligações 1,4 glicosídicas, formando o maior componente da biomassa vegetal e compreendendo a parede celular das plantas juntamente com a lignina e a hemicelulose. A capacidade de converter celulose em substratos menos complexos é de crucial importância para o ciclo do carbono na natureza (SILVA *et al*, 2015).

Em geral, a celulose é uma substância fibrosa, resistente e insolúvel em água que desempenha um papel crucial na preservação da estrutura das fibras naturais. É definido como uma cadeia polimérica longa de moléculas de glicose em anel e possui uma conformação plana em forma de fita polímero natural que consiste em unidades de 1,4-anidro-D-glucopiranoose, como mostrado na Figura 5 (MOON *et al*, 2011).

Figura 5 – Representação esquemática da estrutura química e das ligações intra- e inter-moleculares de hidrogênio na celulose



Fonte: TRACHE *et al*, 2017.

As celuloses não existem como entidades individuais, são várias cadeias de moléculas de celulose (30 a 100 cadeias) podendo ser empacotadas juntas via forças de van

der Waals e ligações de hidrogênio para formar a unidade básica da celulose, que são fibrilas elementares (protofibrilas) em nanoescala (TRACHE *et al*, 2017).

As celulasas clivam as ligações β (1 \rightarrow 4) da celulose, tornando-as candidatas atrativas para a produção sustentável de etanol celulósico a partir de materiais lignocelulósicos. A maioria das enzimas com atividade celulolítica são hidrolases que foram classificadas em diferentes famílias de acordo com suas similaridades de sequência de aminoácidos e suas estruturas de proteínas resultantes. As celulasas podem ser endocelulasas, que clivam ligações internas na cadeia de celulose; exocelulasas, atuando nas extremidades redutoras ou não redutoras das cadeias de celulose; e β -glicosidases, convertendo celobiose em moléculas de glicose (LÓPEZ *et al*, 2016).

Os micro-organismos de diversos habitats naturais se adaptaram no desenvolvimento de caminhos para a produção de vários sistemas de enzimas extracelulares que irão fazer a conversão de substratos celulósicos em açúcares mais simples e produtos afins, assim são convertidos em fontes de energias úteis (PAYNE *et al*, 2015). Essa complexidade, dos arranjos das celulosas emaranhados com hemicelulose e lignina, dificulta a ação das enzimas celulasas. Portanto, os micro-organismos degradadores de biomassa que ocorrem naturalmente produzem um aglomerado de enzimas hidrolíticas de efeitos sinérgicos para degradar a biomassa de natureza complexa (LEO *et al*, 2019).

Micro-organismos são considerados como principais produtores de celulasas, o que os tornam essenciais na decomposição da biomassa vegetal. Até pouco tempo, os fungos eram considerados os principais degradadores de biopolímeros de origem vegetal, contudo já são conhecidas bactérias que também contribuem de forma significativa nessa atividade e grande parte dessas bactérias, pertencem aos filos Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria e Bacteroidetes. As bactérias celulolíticas têm sido tradicionalmente pesquisadas em uma ampla variedade de nichos ambientais e industriais, incluindo solo e sedimentos marinhos (MEDIE *et al*, 2012).

A triagem e o isolamento dos produtores microbianos de celulase geram a oportunidade de obtenção de enzimas com características diferenciais. Essas enzimas normalmente são produzidas por saprófitos que crescem em matéria orgânica morta e em decomposição, estes são isolados de amostras de solo obtidas de florestas e reservas naturais, fontes de água quente, esgoto, esterco animal e rúmen bovino (JUTURU & WU, 2014).

Entre os micro-organismos, os fungos filamentosos são os decompositores de celulose mais dinâmicos e são responsáveis por uma grande parte da hidrólise dos componentes celulósicos de biomassas lignocelulósicas do ambiente. As celulasas fúngicas são observadas principalmente entre os filos Ascomycota e Basidiomycota. As celulasas fúngicas mais eficazes e exploradas pertencem aos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Myrothecium*, *Hemicola* entre outros (LEO *et al*, 2019).

As bactérias também são renomadas degradadoras de celulose (KUHAD *et al*, 2011). Entre elas, os gêneros anaeróbicos de *Clostridium* e *Acetivibrio* e gêneros aeróbicos de *Bacillus* e *Pseudomonas* são os mais estudados (SADHU & MAITI, 2013). A Tabela 1 mostra alguns dos principais produtores microbianos de celulase.

Tabela 1 – Micro-organismos produtores de celulase

| Fungos | Bactérias |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| <i>Acremonium cellulolyticus</i> | <i>Clostridium thermocellum</i> |
| <i>Aspergillus acculeatus</i> | <i>Ruminococcus albus</i> |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>Aspergillus niger</i> | |
| <i>Fusarium solani</i> | |
| <i>Irpex lacteus</i> | |
| <i>Penicillium fummiculosum</i> | |
| <i>Phanerochaete</i> | |
| <i>Chrysosporium</i> | Actinomicetos |
| <i>Schizophyllum commune</i> | <i>Streptomyces</i> sp. |
| <i>Sclerotium rolfsii</i> | <i>Thermoactinomyces</i> sp. |
| <i>Sporotrichum cellulophilum</i> | <i>Thermonospora curvata</i> |
| <i>Talaromyces emersonii</i> | |
| <i>Thielavia terrestris</i> | |
| <i>Trichoderma koningii</i> | |
| <i>Trichoderma reesei</i> | |
| <i>Trichoderma viride</i> | |

Fonte: AFOLABI, 2014.

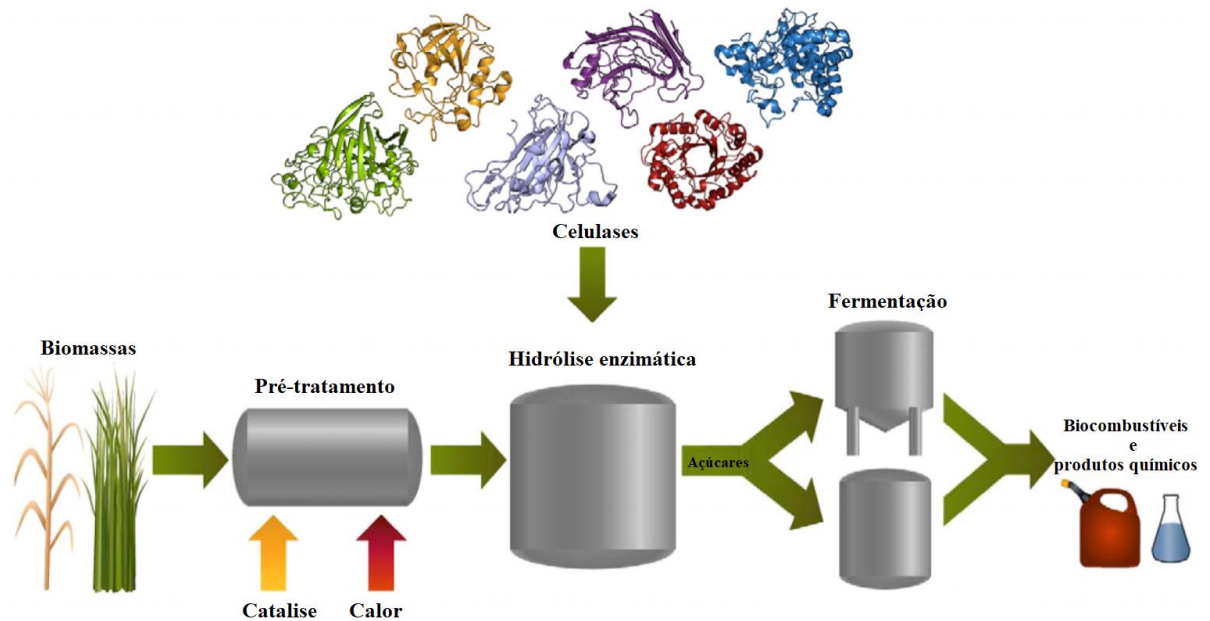
As aplicações da celulase englobam uma grande variedade de fins industriais, como a indústria têxtil, indústria de papel e celulose e indústria alimentícia como um aditivo para detergentes e para melhorar a digestibilidade dos alimentos para animais. Essas celulasas representam uma parte significativa do mercado mundial de enzimas e com a preocupação crescente sobre o esgotamento do petróleo e as emissões de gases de efeito estufa, a motivação para a produção de bioetanol a partir da lignocelulose tem crescido. No entanto, os custos da celulase para hidrólise dessas biomassas pré-tratadas, precisam ser reduzidos e sua eficiência catalítica deve ser melhorada para tornar o processo economicamente viável (KUHAD *et al*, 2011). Com o objetivo de proteger o meio ambiente e reduzir a dependência de fontes de energia não renováveis, o desenvolvimento de fontes alternativas de energia tem se tornado cada vez mais importante (PROMON *et al*, 2018).

O etanol de segunda geração utiliza diferentes tipos de materiais lignocelulósicos como substrato. Biomassas de diferentes fontes, como a agrícola, aquática e a silvicultura, podem ser consideradas para a produção de biocombustíveis. Dependendo da fonte e da tecnologia de produção, esses biocombustíveis são categorizados em primeira, segunda, terceira e quarta gerações. Os biocombustíveis de segunda geração compreendem os produzidos a partir de culturas não alimentares, como biomassa lignocelulósica e bio-resíduos (LENNARTSSON *et al*, 2014).

Na produção do bioetanol de segunda geração é necessária aplicação de uma grande quantidade de celulase, em torno de 100 g de enzimas são utilizadas para produção de 1 galão de etanol celulósico (ZHANG & ZHANG, 2013). A estrutura altamente cristalina da celulose e a composição heterogênea da hemicelulose na biomassa lignocelulósica requer pré-tratamento químico e físico além de processos de tratamento enzimático que aumentam o custo de todo o processo e, portanto, se revelam um grande obstáculo para a produção em larga escala (RASTOGI & SHRIVASTAVA, 2017).

As celulasas podem ser usadas para converter a porção de celulose da biomassa não alimentar, como resíduos agrícolas e culturas energéticas, em açúcares fermentáveis para posterior conversão em combustíveis renováveis e produtos químicos (PAYNE *et al*, 2015). A Figura 6 apresenta um esquema de funcionamento da produção do etanol de segunda geração.

Figura 6 – Visão geral de um processo de conversão bioquímica convencional para produzir combustíveis e produtos químicos a partir de biomassa lignocelulósica.



FONTE: Adaptado de PAYNE *et al*, 2015.

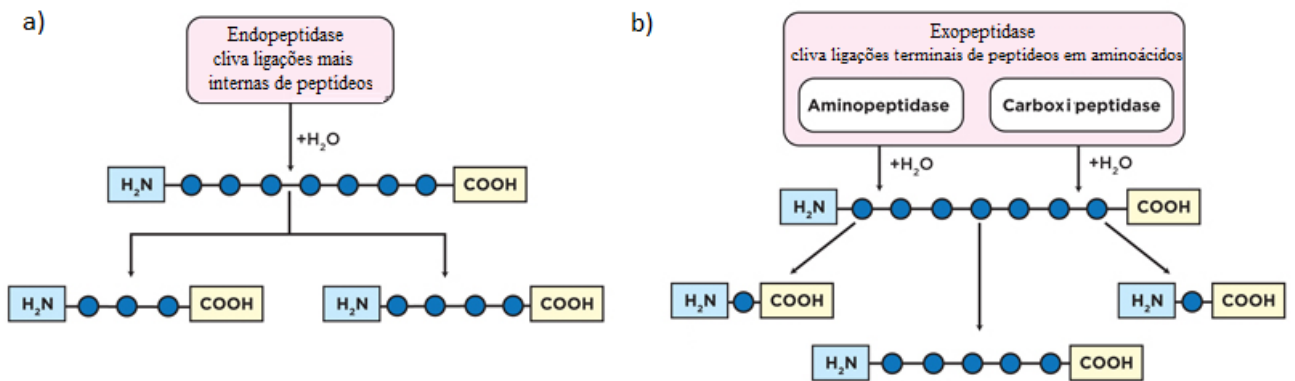
A terceira maior enzima industrial do mundo é a celulase, e para produzir uma grande variedade de celulases ambos os fungos e bactérias são fortemente explorados (ACHARYA & CHAUDHARY, 2012). A seleção das enzimas celulolíticas com atividades melhoradas na hidrólise enzimática eficiente da biomassa continua a ser um desafio para a indústria de biorrefinaria (TIWARI *et al*, 2017). Portanto, é necessário fortalecer a pesquisa sobre o trabalho básico como a bioprospecção e seleção de linhagens de micro-organismos celulolíticos de alta eficiência que atendam às necessidades de diferentes indústrias (YAN *et al*, 2019).

1.1.3.3 Protease

As proteases (peptidases ou enzimas proteolíticas) constituem um grande grupo de enzimas que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas em outras proteínas. A clivagem das ligações peptídicas leva à degradação dos substratos proteicos em seus aminoácidos constituintes, ou pode ser específica, levando à clivagem seletiva de proteínas para modificação e processamento pós-tradução (SOUZA *et al*, 2015).

A função fisiológica desempenhada pelas proteases é essencial para todo organismo vivo. Com base no local de ação sobre substratos proteicos, as proteases são amplamente classificadas como endopeptidases ou enzimas exopeptidases (Figura 7) (SAWANT & NAGENDRAN, 2014).

Figura 7 – Clivagens em diferentes sítios de ligação realizada por proteases.

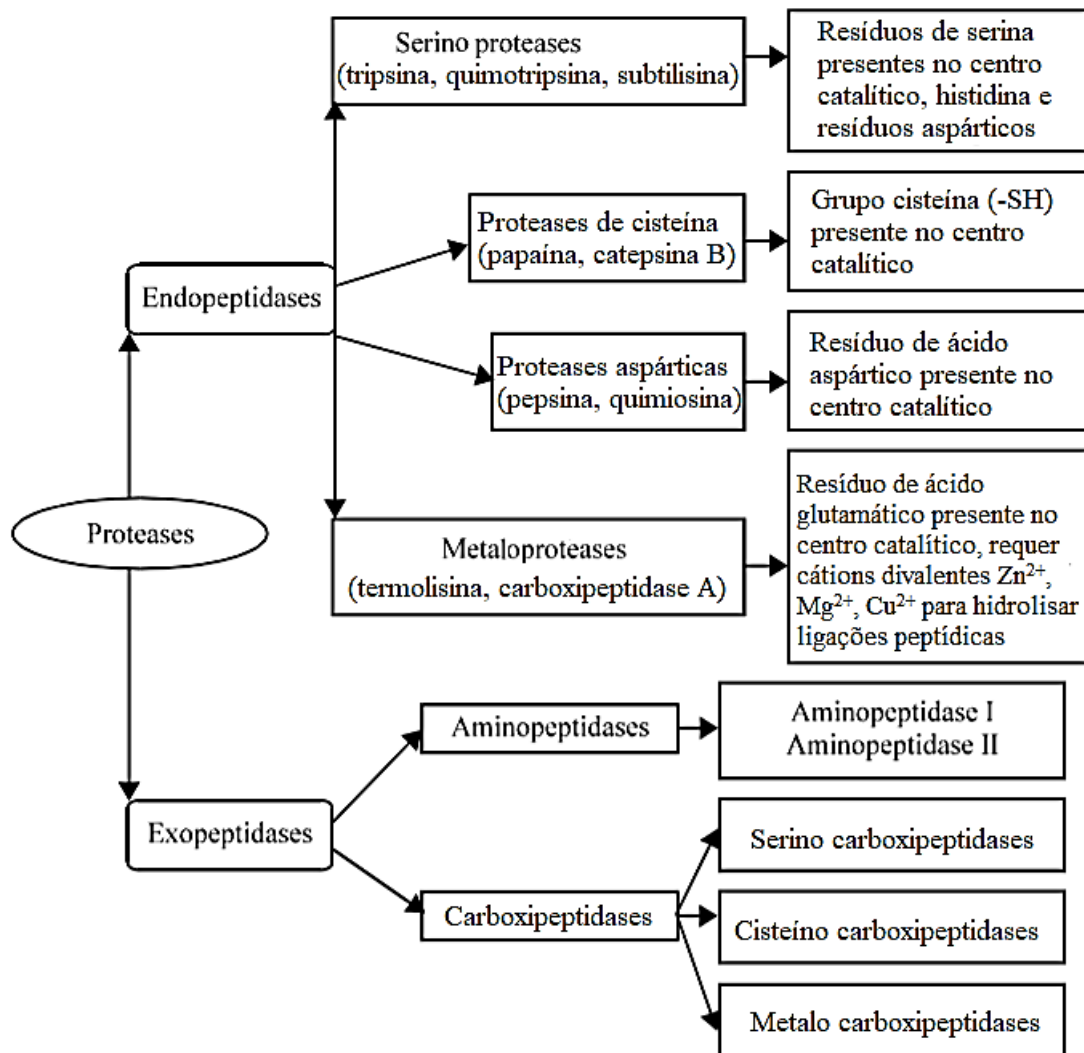


a) Endopeptidase agindo no meio das cadeias peptídicas; b) Exopeptidases agindo nas ligações terminais das cadeias peptídicas, sendo caracterizadas por serem aminopeptidases quando próxima a terminação H₂N e carboxipeptidase quando a clivagem ocorre na extremidade COOH.

FONTE: Adaptado de deerland.com/glutalytic/gluten-digestion, 2015.

De acordo com o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, as proteases são classificadas no subgrupo 4 do Grupo 3, pertencente às hidrolases. Essas enzimas também são classificadas como serina-proteases, proteases aspárticas, proteases de cisteína ou metaloproteases, dependendo do mecanismo catalítico. As proteases também podem ser classificadas em diferentes famílias, dependendo de suas sequências de aminoácidos e relações evolutivas. Com base no pH ótimo, são denominadas proteases ácidas, neutras ou alcalinas (Figura 8) (JISHA *et al*, 2013).

Figura 8 – Classificação das Proteases.



Fonte: Adaptado de KUMAR *et al*, 2008.

Enzimas proteolíticas são conhecidas por serem onipresentes, encontradas em todos os organismos vivos e são essenciais para o crescimento e diferenciação celular. Proteases extracelulares costumam ter grande valor comercial e possuem múltiplas aplicações em setores industriais diversos (KUMAR *et al*, 2016).

As proteases constituem um dos grupos enzimáticos de maior valor comercial, têm aplicações potenciais em um grande número de processos industriais, como alimentos, ração, couro, têxtil e indústrias farmacêuticas. Essas enzimas podem ser obtidas principalmente de animais, plantas e micro-organismos. Porém, as proteases de fontes

microbianas dominam sua presença em aplicações industriais devido à fácil disponibilidade e rápida taxa de crescimento dos micro-organismos (SINGH *et al*, 2016). Os habitats enriquecidos com proteínas à base de resíduos são os recursos mais adequados dos agentes proteolíticos. Números elevados de fungos e bactérias proteolíticas já foram isolados, mas poucos deles são explorados comercialmente (GAUTAM & AZMI, 2017).

As proteases fúngicas atraem cada vez mais o interesse de pesquisas devido à alta diversidade, ampla especificidade de substrato e estabilidade sob condições extremas, além de serem usadas para modificar proteínas alimentares (JISHA *et al*, 2013). Muitas espécies de *Aspergillus*, como *A. candidus*, *A. flavus*, *A. fumigatus* entre outros, e espécies de *Cephalosporium* e *Chrysosporium* são conhecidas como fontes de proteases fúngicas (RAZZAQ *et al*, 2019).

As proteases de origem bacteriana têm maior importância e aplicabilidade comercial nas indústrias de lavanderia, alimentos, couro e seda devido à sua alta capacidade de produção e atividade catalítica. As espécies de *Alteromonas* spp., *Brevibacterium linens* e *Lactobacterium helveticus* são algumas das principais produtoras bacterianas de proteases (KUMAR *et al*, 2016). No setor industrial, *Bacillus* spp. são os produtores de protease alcalina extracelular mais ativos e dinâmicos (RAZZAQ *et al*, 2019). As proteases alcalinas bacterianas são caracterizadas por sua alta atividade em pH alcalino (8 - 12), com temperatura ideal entre 50 °C e 70 °C. Essas propriedades as tornam adequadas para uso na indústria de detergentes (JISHA *et al*, 2013).

Os micro-organismos utilizados na produção de proteases são geralmente isolados em locais com condições específicas ou adversas que refletem o tipo e as características da enzima que será produzida (Tabela 2) (SANTOS & SATO, 2018).

Tabela 2 – Exemplos de fontes de isolamento de micro-organismos produtores de protease.

| Identificação do microrganismo selecionado | Fonte de isolamento |
|--|--|
| Bactérias | |
| <i>Aeromonas veronii</i> | Tripa de peixe <i>Mugil cephalus</i> |
| <i>Bacillus cereus</i> | Área contaminada com produtos químicos |
| <i>Bacillus cereus</i> | Solo contaminado e sedimentos marinhos |
| <i>Bacillus cereus</i> | Solos contaminados de uma fábrica de madeira |
| <i>Bacillus pumilus</i> | Água contaminada |
| <i>Bacillus sphaericus</i> and <i>Bacillus subtilis</i> | Sedimentos marinhos |
| <i>Brevibacillus</i> | Solo da fazenda de gado |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Solo contaminado com petróleo bruto |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Solos contaminados de uma fábrica de madeira |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Solo próximo a uma unidade de extração de solvente |
| <i>Streptomyces</i> sp. | Solo da região árida |
| <i>Streptomyces</i> sp. | Líquenes da Amazônia |
| Fungos | |
| <i>Aspergillus clavatus</i> | Águas residuais |
| <i>Aspergillus flavus</i> and <i>Aspergillus terreus</i> | Solo em torno da indústria do couro |
| <i>Aspergillus</i> sp. | Solo |
| <i>Beauveria felina</i> | Solo da indústria de fabricação de farelo de soja |
| <i>Mucor</i> sp. | Estrume herbívoro |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> | Solo |
| <i>Penicillium</i> sp. | Solo da indústria de fabricação de farelo de soja |

Fonte: SANTOS & SATO, 2018.

Além de suas aplicações industriais e medicinais, as proteases desempenham um papel importante na pesquisa básica. Sua clivagem seletiva de ligação peptídica é usada na elucidação da relação estrutura-função, na síntese de peptídeos e no sequenciamento de proteínas (PRATUSH *et al*, 2013). Segundo pesquisadores, as proteases controlam a ativação, síntese e renovação de proteínas para regular os processos fisiológicos, por isso são vitais na disseminação de doenças infecciosas e, devido ao seu papel significativo no ciclo de vida, são essenciais para a descoberta de medicamentos (RAZZAQ *et al*, 2019).

Diversos estudos indicaram numerosas funções fisiológicas proveniente de proteases incluindo atividades antitrombóticas, antioxidantes, opióides, efeitos citomodulatórios e imunomodulatórios, propriedades antimicrobianas, atividade inibidora da angiotensina enzima conversora I (ECA), antiobesidade e atividade antigenotóxica (SILVA, 2017). Peptidases bacterianas e fúngicas, como as enzimas comerciais Alcalase®, Neutrase®

e Flavourzyme® e enzimas prospectadas em espécies microbianas, são amplamente relatadas para a síntese de peptídeos bioativos (CASTRO & SATO, 2014).

1.1.3.3.1 Colagenase

A colagenase foi identificada pela primeira vez em 1962 e são as enzimas que quebram quatro tipos de colágeno (I, II, III e IV) (ALIPOUR *et al*, 2016). Existem 29 colágenos distintos, e cada colágeno difere consideravelmente em sua sequência, estrutura e função de aminoácidos. A proteólise do colágeno é essencial para inúmeras funções fisiológicas, incluindo remodelação de tecidos, morfogênese e cicatrização de feridas (PAL & SURESH, 2016).

O colágeno tem sido reconhecido como um fator contribuinte essencial em inúmeras patologias, como disseminação de células tumorais, artrite, ulcerações teciduais, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e doenças periodontais. Devido a diminuição da síntese de colágeno corporal, sua demanda pela pele, cabelos e tecidos ósseos, aumenta com o envelhecimento (ABDEL-FATTAH, 2013).

Alguns tipos de colagenases já foram descritas como inespecíficas, degradando apenas regiões não helicoidais do colágeno. O grupo de colagenases verdadeiras inclui membros selecionados da família das metaloproteases e catepsina K, que contribuem para a proteólise da matriz extracelular e podem clivar regiões triplas helicoidais nas três cadeias do colágeno nativo (ABFALTER *et al*, 2016).

As aplicações das colagenases microbianas são amplas e incluem áreas como as indústrias de alimentos, curtumes, carnes, cosméticos e produção de compostos farmacêuticos (PAL & SURESH, 2016). Essas enzimas podem ser usadas para tratar queimaduras, feridas, tecido cicatricial, transplante de órgãos específicos, doença de Peyronie, fibrose destrutiva, cirrose hepática e limpeza do sangue para melhorar a triagem nos diagnósticos médicos (DUARTE *et al*, 2016).

Utilizando enzimas colagenolíticas também é possível isolar células intactas do parênquima hepático, células adiposas e supra-renais (TUOHETAHUNTILA *et al*, 2015). A colagenase também foi aplicada na técnica de bandagem G para estudar os cromossomos

humanos. Atualmente, essa enzima tem sido empregada como tratamento menos invasivo de doenças nas quais a deposição excessiva de colágeno pode causar distúrbios fisiológicos (ALIPOUR *et al*, 2016).

Os trabalhos mais extensos foram relatados utilizando colagenases bacterianas devido a capacidade de degradar colágenos nativos e desnaturados. Essas enzimas de fonte bacteriana foram relatadas sendo produzidas por *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Vibrio* e *Streptomyces* sp. (GAUTAM & AZMI, 2017; WANDERLEY *et al*, 2017).

Nos últimos anos, a atividade colagenolítica tem sido explorada em aplicações clínicas e terapêuticas, particularmente no tratamento da doença de Dupuytren, um distúrbio conjuntivo comum da fáscia palmar da mão, que evolui para contratura progressiva na flexão dos dedos. A *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a colagenase produzida por *Clostridium histolyticum* (Collagenase *Clostridium Histolyticum* Injection) para o tratamento da Dupuytren em 2010 (LIMA *et al*, 2013; SMERAGLIA *et al*, 2016; WATT *et al*, 2011). As colagenases produzidas por *Clostridium histolyticum* foram as primeiras colagenases com aplicação médica a serem descobertas e estudadas (VAN WART, 2013).

A pomada dermatológica Kollagenase[®] é um produto com preparação proteolítica enzimática obtida a partir de culturas do *Clostridium histolyticum*, que após purificação cromatográfica, apresenta-se constituída por uma série de peptidases, das quais o componente principal é a colagenase (EC 3.4.24.3). Essa formulação é utilizada como agente desbridante enzimático associado à antibioticoterapia tópica, em feridas, lesões necróticas, úlceras, gangrenas de extremidade, lesões por congelamento, condições associadas à difícil cicatrização, queimaduras e feridas onde se torne necessário o desbridamento enzimático da lesão (MÓDOLO, 2020). Outros produtos de colagenase produzida pela mesma fonte bacteriana podem ser encontradas na indústria farmacêutica, principalmente como constituinte em pomadas tais como Iruxol[®] Mono, Xiaflex[®] e Collagenase Santyl (DRUGBANK, 2020).

A produção de colagenase por fungos já foi relatada entre os gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* e *Alternaria* (WANDERLEY *et al*, 2016). Como as proteases fúngicas são capazes de hidrolisar muitas outras proteínas além do próprio colágeno, a demanda de pesquisas por colagenases provenientes desses micro-organismos tem

se mostrado um ramo de alto interesse com alta aplicação e potencial biotecnológico (SHARKOVA *et al*, 2015).

Um estudo recente evidenciou a produção de proteases aspárticas com atividade colagenolítica produzidas por *Thermomucor indicae-seudaticae* (PEREIRA *et al*, 2020). O fungo *Fusarium* sp. também foi relatado como produtor de queratinase, possuindo também atividade colagenolítica (CALIN *et al*, 2019).

Pesquisas por novas fontes de colagenases aumentaram ao longo dos anos com os avanços das pesquisas médicas (WANDERLEY *et al*, 2016). Existe um interesse gradativo em encontrar novas linhagens microbianas capazes de produzir colagenases com novas propriedades para formulações de novos medicamentos para a indústria farmacêutica (BLIEVA *et al*, 2018).

1.1.3.3.2 Gelatinase

A gelatina é um biopolímero proteico e solúvel de alto peso molecular obtido por hidrólise parcial do colágeno (GOMEZ-GUILLEN *et al*, 2011). Os componentes gelatinosos possuem várias propriedades funcionais, incluindo capacidade de formação de biofilme, capacidade de ligação à água, espuma e propriedades emulsificantes, sendo considerado um constituinte importante em alimentos, medicamentos e cosméticos (AHMAD *et al*, 2019).

As enzimas gelatinases são metaloproteinases da matriz (MMPs), uma família de endopeptidases dependentes de zinco que regulam a degradação da matriz extracelular (MEC). Desempenham papel central em muitos processos fisiológicos e patológicos de diferentes tecidos, atuando especificamente nos diferentes segmentos da MEC, como colágeno, gelatina e elastina (SINGH *et al*, 2015). As MMPs são categorizadas como: colagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelisinases (MMP-3, MMP-10 e MMP-11), matrilisina (MMP-7), metaloelastase (MMP-12) e metaloproteinases da matriz de membrana (MT-MMP 1, 2, 3 e 4) (GALASSO *et al*, 2012).

As gelatinases desempenham atividades na reprodução e remodelação de tecidos, bem como em doenças como artrite, doenças cardiovasculares e neurológicas e em

alguns casos de câncer metastáticos. Desta forma, estas enzimas são alvos clinicamente importantes para o desenvolvimento de medicamentos (JOSEPH & SASIDHARAN, 2019).

A produção de gelatinases em micro-organismos já foi evidenciada em bactérias e está relacionada a aureolisina de *Staphylococcus aureus* e a elastase de *Pseudomonas aeruginosa*, além de estarem relacionadas a virulência de algumas dessas cepas (POTEMPA & PIKE, 2009). A produção de gelatinase por *Enterococcus faecalis* foi constatada como um fator potencial para a adesão bacteriana (GUNESER & ELDENIZ, 2016). Algumas cepas de fungos patogênicos, como *Aspergillus fumigatus*, secretam proteases durante a infecção e as proteases produzidas são classificadas em proteases aspárticas, serino proteases e metaloproteases (YIKE, 2011). Os papéis das metaloproteases secretadas por fungos patogênicos estão amplamente associados à degradação tecidual (STAATS *et al*, 2013). Pesquisadores vêm buscando principalmente por espécies microbianas não patogênicas com potencial para a produção em larga escala de gelatinase (EKPENYONG *et al*, 2016).

A busca por proteases com atividade gelatinolítica aumentou nos últimos anos devido às inúmeras aplicações que a enzima encontrou nas indústrias química, médica e de processamento de alimentos (EKPENYONG *et al*, 2016). Com as potenciais aplicações das gelatinases e sua alta demanda, existe a necessidade da descoberta de novas cepas microbianas que produzem enzimas com novas propriedades e o desenvolvimento de formulações farmacêuticas de baixo custo e extração (BALAN *et al*, 2012).

1.1.4 Metabólitos microbianos com potencial antimicrobiano

Há uma necessidade perpétua da busca por novas fontes de antibióticos no combate a doenças e patógenos cada vez mais resistentes aos medicamentos. Essa resistência adquirida tem se tornando uma ameaça significativa à saúde pública com o passar dos anos (XIONG *et al*, 2013). Nas últimas décadas, houve um enorme aumento no uso de antibióticos nas clínicas, na agricultura e na pecuária. Paralelamente, os micro-organismos desenvolveram uma série de estratégias para lidar com esses antibióticos, atingindo a resistência múltipla a medicamentos pela evolução dos genes de resistência a antibióticos (NAZIR *et al*, 2017).

A descoberta e o desenvolvimento de novos medicamentos a partir de produtos naturais desempenharam um papel significativo nas últimas décadas. Além de plantas e animais, os micro-organismos representam um recurso importante para a descoberta de novas fontes terapêuticas. Mais de 50.000 produtos naturais microbianos fundamentais foram obtidos e selecionados como medicamentos eficazes e seguros (NEWMAN & CRAGG, 2007).

Os antibióticos são amplamente distribuídos na natureza, onde desempenham um papel importante na regulação da população microbiana de solo, água, esgoto e composto. Das centenas de antibióticos produzidos naturalmente que foram purificados, apenas alguns foram suficientemente potentes para serem utilizados na prática médica (SETHI *et al*, 2013). Essas moléculas complexas com diferentes grupos funcionais em suas estruturas químicas são divididas em várias classes, dependendo dos mecanismos de ação, ou seja, inibição da síntese da parede celular, alteração das membranas celulares, inibição da síntese proteica, inibição da síntese de ácidos nucleicos, antagonismo competitivo e atividade antimetabólita (CYCON *et al*, 2019).

Atualmente, diversos compostos antimicrobianos estão disponíveis para utilização sendo a tetraciclina, cloranfenicol, estreptomicina, eritromicina, rifampicina, cefalosporina e a vancomicina, alguns dos mais conhecidos e amplamente utilizados (BEACH *et al*, 2012). Micro-organismos dos gêneros *Penicillium*, *Streptomyces*, *Cephalosporium*, *Micomonospora* e *Bacillus* são alguns dos representantes mais conhecidos na produção de antimicrobianos altamente comercializáveis pela indústria farmacêutica (SETHI *et al*, 2013).

A versatilidade da estrutura microbiana e sua ampla aplicabilidade tornaram esses organismos fundamentais para o estudo da microbiologia e da biotecnologia moderna (FRISK, 2011). A grande maioria dos componentes antimicrobianos encontrados na atualidade são resultados da bioprospeção de micro-organismos pertencentes a ambientes pouco explorados com características diferenciadas proporcionadas pelo próprio ambiente ao qual pertencem (WAKEFIELD *et al*, 2017).

Explorar micro-organismos ambientais e elucidar quais substâncias antimicrobianas eles produzem é de fato uma estratégia clássica para encontrar novos antibióticos. Existem evidências de fungos que vivem em ambientes onde as bactérias multirresistentes estejam prosperando, sejam capazes de desenvolver compostos diferenciados além da produção das classes conhecidas de antibióticos (SVAHN *et al*, 2012).

A capacidade das comunidades microbianas de se adaptarem à presença de múltiplos compostos tóxicos é importante para a estabilidade dos processos biológicos que ocorrem nos ecossistemas (MENZ *et al*, 2017). Vários micro-organismos quando expostos a condições ambientais diferenciais e estresses fisiológicos específicos tendem a produzir metabólitos secundários especializados, essenciais para sobrevivência que podem ser aproveitados e explorados para o benefício social (WAKEFIELD *et al*, 2017). Historicamente, os actinomicetos têm sido a principal fonte de antibióticos e, os fungos filamentosos não foram estudados na mesma extensão, apesar de sua capacidade de produzir diversas matrizes de metabólitos secundários (NIELSEN *et al*, 2017).

O estilo de vida expõe fungos filamentosos a antagonistas. Os fungos filamentosos organizam suas células em arranjos lineares, cenocíticos, chamados hifas, que se estendem nas pontas e são capazes de se ramificar e se fundir, levando a uma rede tridimensional solta denominada micélio (STAJICH *et al*, 2009). Essa arquitetura representa uma adaptação ideal ao estilo de vida dos fungos, pois maximiza a superfície para absorção de nutrientes e permite que o fungo alcance e colonize eficientemente seus substratos (KUNZLER, 2018).

Os diferentes tecidos fúngicos são expostos a diferentes tipos de antagonistas dependentes do nicho ecológico do fungo. O micélio vegetativo de um fungo saprófita, por exemplo, é exposto a outros micro-organismos que competem pelos mesmos nutrientes e podem se alimentar dos produtos de degradação liberados pela ação das enzimas hidrolíticas secretadas pelo fungo (BILLS & GLOER, 2013). A principal estratégia de defesa dos fungos é a defesa química, ou seja, a produção de toxinas que prejudicam o crescimento, desenvolvimento ou viabilidade dos antagonistas pelo fungo. Esses efetores de defesa incluem metabólitos secundários, e proteínas que geralmente agem pela ligação a moléculas-alvo específicas dos antagonistas (DING *et al*, 2016).

Em 1928 a Penicilina foi descoberta, e após isso, muitos esforços foram empreendidos para identificar e melhorar os novos antibióticos betalactâmicos, a fim de combater mecanismos de resistência que já emergiam naquela época (SVAHN *et al*, 2012). O gênero *Penicillium* é composto por mais de 354 espécies, das quais várias são de importância industrial. Um dos principais representantes é o produtor industrial de penicilina *Penicillium rubens*, outros *Penicillium* são usados para a produção de metabólitos secundários

farmacêuticos, enzimas como celulases e na fabricação de produtos alimentares (NIELSEN *et al*, 2017).

Vários fungos do gênero *Aspergillus* também são conhecidos por sua capacidade de produzir vários metabólitos bioativos para a indústria farmacêutica, como o ácido terrecíclico, metabólito com atividade anticâncer e antibacteriana, e lovastatina utilizada para a redução do colesterol, ambos produzidos pelo fungo *Aspergillus terreus* (BRACARENSE & TAKAHASHI, 2014).

Muitas espécies de *Streptomyces*, *Bacillus* e *Penicillium* têm sido estudadas continuamente por sua capacidade de produzir antibióticos. Além disso, devido ao fato de as espécies de *Bacillus* serem produtoras de antibióticos de estrutura proteica solúvel e por esses antibióticos serem mais baratos e mais eficazes em estudos realizados até o momento, esses micro-organismos são preferíveis na produção comercial. Foi relatado que membros da espécie *Bacillus* geralmente produzem bacteriocinas do tipo polipeptídico que afetam bactérias Gram-positivas (SETHI *et al*, 2013).

O ambiente aquático está se tornando cada vez mais apreciado como um reservatório rico e inexplorado de novos produtos naturais úteis. Sabe-se que o ambiente aquático contém grupos bacterianos taxonomicamente diversos que exibem características fisiológicas e estruturais únicas que lhes permitem sobreviver em condições ambientais extremas, com a produção potencial de novos metabólitos secundários não observados em micro-organismos terrestres (TAWIAH *et al*, 2012). Assim, a busca por células microbianas potencialmente produtoras de enzimas e metabólitos secundários de interesse industrial incluindo o farmacêutico, provenientes de estação de tratamento de efluente têxtil, torna-se estrategicamente promissora tendo em vista a adaptação microbiana a este ambiente hostil, estando em contato com compostos tóxicos os quais fazem com que a comunidade microbiana ali presente, apresentem capacidades metabólicas únicas para sobreviver neste habitat.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o potencial biotecnológico de fungos e bactérias isolados de uma estação de tratamento de indústria têxtil quanto a sua capacidade de produção de enzimas para aplicações industriais como a celulase, enzimas com potencial aplicação na área médica como a lacase e as proteases (gelatinase e colagenase), além de metabólitos com ação antimicrobiana.

2.2 Objetivos específicos

- Realização de triagens enzimáticas na busca por celulasas a partir de microorganismos isolados (análises qualitativas e quantitativas);
- Avaliação das atividades de lacase e proteases (gelatinase e colagenase) com potencial aplicação na área médica (análises qualitativas e quantitativas);
- Avaliação da atividade antimicrobiana dos isolados contra bactérias patogênicas (análises qualitativas e quantitativas);
- Identificação dos isolados de interesse biotecnológico por Taxonomia Polifásica (análises morfológicas e moleculares).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reativação e preparo das células microbianas

Foram utilizados 105 isolados microbianos (45 bactérias e 60 fungos filamentosos), previamente recuperados de uma amostra de uma estação de tratamento de indústria têxtil situada no oeste do Paraná. As amostras estavam preservadas em glicerol 20% (-20°C) no Laboratório de Biotecnologia Ambiental da UNILA.

As amostras bacterianas foram reativadas em meios de cultura sólidos nutriente Agar (NA) contendo: 3 g L⁻¹ de extrato de carne, 5 g L⁻¹ de peptona e 15 g L⁻¹ de ágar. O meio de cultivo foi vertido em placas de Petri estéreis onde as bactérias foram estriadas e em seguida armazenadas em estufa a temperatura de 37°C para crescimento das colônias. O período de incubação foi entre 24h à 72h.

Os fungos filamentosos foram reativados através do meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA) contendo: caldo de 200 g de batata, 10 g L⁻¹ de açúcar e 14 g L⁻¹ de agar. O meio de cultivo foi vertido em placas de Petri, e os fungos foram inoculados e incubados em estufa a 28°C para crescimento durante 7 a 21 dias.

3.2 Preparação dos extratos enzimáticos (Crescimento microbiano em meio líquido)

Para preparação dos extratos bacterianos, as bactérias foram colocadas em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 30 mL do meio de cultivo líquido nutriente (NB) (3 g L⁻¹ de extrato de carne e 5 g L⁻¹ de peptona) e incubadas sob agitação mecânica em *shaker* (150 rpm) a temperatura de 37°C durante 24h. Após o crescimento, os extratos foram centrifugados a 5.000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante correspondente ao extrato metabólico foi separado das células com auxílio de uma pipeta estéril.

Os fungos filamentosos também foram submetidos a crescimentos em Erlenmeyers de 50 mL contendo 30 mL do meio de cultivo (Extrato de malte 3%). Três quadrados (1x1cm), foram recortados do meio sólido contendo micélio de amostras dos fungos filamentosos (de um crescimento microbiano novo), e foram inoculadas nos

Erlenmeyers, sendo incubados sob agitação (150 rpm) a temperatura de 28°C durante 7 dias. Após o crescimento as amostras foram filtradas a vácuo em papel filtro 0,45 µm e posteriormente centrifugadas a 5.000 rpm durante 10 minutos para total separação das células. O sobrenadante metabólico foi separado das células com auxílio de uma pipeta estéril.

3.3 Produção de Lacase

3.3.1 Triagem em placas com Guaiacol

Os micro-organismos reativados foram submetidos a triagem inicial para produção da enzima lacase através de meios de cultura preparados contendo guaiacol como indicador para fenol-oxidases.

As bactérias reativadas foram semeadas em meios de cultivo sólido ágar nutriente (NA), acrescido de 425 µL de guaiacol 99% na preparação do meio de cultivo, e levadas para a estufa a 37 °C durante 3 dias para o crescimento das colônias. Uma coloração marrom escura no verso do meio de cultivo foi considerada indicativo de atividade positiva para lacase.

Para os fungos filamentosos, foram inoculados cubos de 1 cm de diâmetro contendo colônias fúngicas reativadas em placas de Petri com meio de cultivo sólido BDA, acrescido de 425 µL de guaiacol 99%. Em seguida as placas foram levadas a estufa a 28°C para crescimento durante 14 dias. A formação de halos escuros ao redor das colônias foi considerada como atividade positiva para lacase (SUN *et al*, 2017).

3.3.2 Quantificação da produção de lacase com ABTS

A quantificação da produção de lacase foi realizada apenas com os isolados considerados positivos no item 3.3.1, através do método espectrofotométrico indireto utilizando como substrato o ABTS (2,2 azino-bis etilbentiazoline).

Foram preparados fracos em duplicata com 30 mL do meio de cultivo NB para as bactérias e Extrato de malte 3% para as amostras de fungos filamentosos. Uma alçada foi utilizada para inoculação das colônias bacterianas do meio de cultivo sólido para o meio de cultivo líquido que posteriormente foi incubada a 37°C em agitação em *Shaker* (150 rpm) durante 24 horas. Dois cubos de 1 cm de diâmetro retirados de cada colônia fúngica positiva no guaiacol foram adicionados em meio de cultivo líquido (Malte 3%) e posteriormente incubados a temperatura de 28°C em agitação mecânica do Shaker (150 rpm) durante 7 dias.

Após o período de crescimento foram separados os extratos dos microorganismos. As bactérias foram centrifugadas (10.000 rpm) durante 10 minutos para separação do sobrenadante e os fungos passaram pelo processo de filtração a vácuo, onde foi utilizada uma bomba a vácuo e papel filtro 0,45 µm para separação das células.

Em tubos de ensaio de 5 mL foram adicionados 1,8 µL de extrato microbiano, 900 µL de tampão acetato e 300 µL do reagente ABTS. A primeira leitura em espectrofotômetro foi realizada logo após a adição do ABTS a solução e uma segunda leitura foi realizada após a incubação das amostras na estufa (temperatura de 28°C para fungos e 37°C para as bactérias) durante 10 minutos após a adição do ABTS. A oxidação do ABTS foi medida pelo monitoramento do aumento da absorbância a 420 nm. A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 mol ABTS por min usando um valor para ABTS oxidado de $3,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, de acordo com a fórmula (BUSWELL *et al*, 1995).

$$U L^{-1} = \frac{(\Delta A)(V_t)(10^6)}{(t)(\epsilon)(V_s)}$$

U Atividade enzimática (µmol min UL⁻¹); ΔA Absorbância final - Absorbância inicial; V_t Volume total da reação (mL); t Tempo de reação (min); ε Coeficiente molar 36,000M⁻¹ cm⁻¹; V_s Volume sobrenadante (mL); 10⁶ Fator de correção (µmol mol⁻¹)

Fonte: BUSWELL *et al*, 1995.

3.4 Produção de celulase

3.4.1 Triagem inicial com corante Vermelho Congo

Para a avaliação da produção de celulase, todos os isolados foram inicialmente colocados em meios de cultivo líquido, NB (Caldo nutriente) e PDB (caldo de 200 g de batata e 10 g L⁻¹ de açúcar), para bactérias e fungos, respectivamente.

Após o crescimento das células microbianas, foi preparado o meio de cultivo sólido para triagem de atividade de celulase contendo MgSO₄ 0,2 g L⁻¹, CaCl₂ 0,02 g L⁻¹, KH₂PO₄ 1 g L⁻¹, K₂HPO₄ 1 g L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 0,5 g L⁻¹, NaNO₃ 0,5 g L⁻¹, Carboximetilcelulose CMC 0,5 %, Extrato de Levedura 0,6 g L⁻¹, Ágar 15 g L⁻¹.

Todos os isolados foram inoculados em meio de cultivo de Carboximetilcelulose (CMC). As bactérias crescidas em 5 mL de meios de cultivo NA líquido durante 24h à 37°C, foram transferidas para placas de Petri com o meio CMC com auxílio de uma micropipeta, onde 10 µL foram inoculados e em seguida incubados a 37°C durante 24h. Para os fungos filamentosos, previamente crescidos em 10 mL de PDB incubados em estufa à 28°C durante 7 dias, 10 µL da amostra foram inoculados no centro da placa de Petri com o meio de CMC, e posteriormente essas amostras foram incubadas a 28°C durante 7 dias.

Após o período de incubação dos micro-organismos, as placas foram retiradas da estufa, e 5 ml corante Vermelho Congo (2,5 g L⁻¹) foram adicionados, sendo as placas novamente incubadas a temperatura ambiente durante 15 minutos. Em seguida, a solução foi descartada e as culturas foram lavadas com 10 mL de uma solução de NaCl 1 M, sendo aguardados mais 15 minutos para revelação dos halos de descoloração nas placas. A atividade de celulase foi considerada positiva onde houve descoloração do corante vermelho Congo, formando halos de atividade enzimática ao redor das colônias (TEATHER & WOOD, 1982).

3.4.2 Quantificação da produção de celulase com o kit Azo-CMCellulase

A quantificação da produção de celulase foi realizada com os isolados considerados positivos no item 3.4.1. Os isolados foram novamente submetidos a crescimentos em meios de cultivo líquido (NB para bactérias e PDB para os fungos) e repetiu-se o processo de separação do extrato enzimático dos micro-organismos realizado no item 3.2. O crescimento celular foi realizado por 24h e 5 dias a 37 ° C e 28 ° C a 150 rpm para bactérias e fungos, respectivamente. Após a obtenção dos extratos a atividade da celulase foi medida com Azo-CM-Celulose (Assay of endo-1,4- β -Glucanase (Cellulase) using AZO-CM-CELLULOSE 09/12, Megazyme, Bray, Irlanda), de acordo com o fabricante, modificado. Foram retirados 20 μ L de extrato da cultura microbiana, sendo misturada com 20 μ L de 2% de Azo-CM-Celulose em 2 \times McIlvaine Buffer (McIlvaine 1921). As reações interrompidas foram centrifugadas a 16.000 g por 1 minuto e 100 μ L do sobrenadante foram retirados. Finalmente, a absorção a 600 nm foi medida e a atividade enzimática foi calculada como descrito pelo fabricante (Megazyme, Bray, Irlanda).

3.5 Produção de protease

3.5.1 Triagem inicial em placas com leite

Para a produção de proteases, todos os isolados foram submetidos a crescimentos em placas de Petri com meio de cultivo contendo leite desnatado como fonte de caseína. As células bacterianas e fúngicas, submetidas ao crescimento em meio de cultivo líquido, foram inoculadas em placas de Petri contendo o meio de cultivo PDA, para fungos e bactérias, respectivamente, acrescido de 10% de leite desnatado fervido, sendo incubados a 28°C durante 7 dias para os fungos filamentosos e 37°C durante 24h para bactérias. A formação de halos transparentes ao redor das colônias dos micro-organismos foi utilizada como evidencia de atividade positiva para produção de protease (FULZELE *et al*, 2011).

3.5.2 Extração de proteínas intracelulares

A metodologia de LOPES & SIERRA (2016) foi realizada com modificações. Os isolados bacterianos e fúngicos positivos para o teste inicial descrito no item 3.5.1, foram reativados em meio de cultivo PDB durante 72 horas. As amostras microbianas foram centrifugadas por 10600 x g rpm, 4°C, durante 10 minutos e o pellet celular foi utilizado para a extração das enzimas. Ao pellet foram adicionados 500µL de tampão de extração (acetato de magnésio 5mM, glicerol 15%, beta-mercaptanol, Tris-HCl 0,1M). A suspensão foi centrifugada durante 5 minutos, e adicionado 500 µL de tampão de extração com 1 mg mL⁻¹ de lisozima no sedimento celular. Esse material foi incubado durante 10 minutos em temperatura ambiente, centrifugado (10600g, 4°C, durante 5 minutos) e o sedimento foi ressuspendido com tampão de sonicação (glicerol 15%, Tris-HCl 0,1M pH 8,8). O banho ultrassônico foi realizado durante 5 minutos a temperatura ambiente, o material foi centrifugado (10600g 4 °C, 30 minutos) sendo o sobrenadante coletado e usado para a avaliação da atividade proteolítica (LOPES & SIERRA, 2016).

3.5.3 Quantificação da produção de protease com Azocaseína

As etapas realizadas neste item 3.5.3 (Produção de protease com Azocaseína) até a o item 3.5.7 (Atividade colagenolítica), foram feitas em parceria com a professora Dra. María Elisa Peichoto no laboratório do Instituto Nacional de Medicina Tropical (INMeT) - Puerto Iguazú, Misiones, Argentina. A atividade caseinolítica foi realizada com os extratos dos isolados positivos no item 3.5.1, os micro-organismos foram colocados para crescimento em caldo PDB para obtenção de fontes de nutrição e glicose em shaker (150rpm), 37°C para o crescimento bacteriano durante 24h e 28°C para crescimento fúngico durante 7 dias, e também com a extração de proteínas realizadas no item 3.5.2. Foi utilizado o ensaio de azocaseína descrito por Wang & Huang, (2002). A mistura de reação foi realizada com 90 µL de azocaseína 5 mg mL⁻¹ e 10 µL da extração de proteínas descrito no item 3.5.2, seguindo uma incubação a 37 °C por 120 min. Posteriormente, a reação foi parada pela adição de 200 µL de ácido tricloroacético a 5% (m/v). Após centrifugação a 12.500 g por 5 minutos para remover o material não hidrolisado, 150 µL do sobrenadante foram misturados com um

volume equivalente de NaOH 0,5 M e a absorbância a 450 nm foi determinada. Para desenhar uma curva de concentração-atividade, foram testadas diluições seriadas de cada amostra. A atividade específica foi expressa em unidades (U) /mg de proteína, sendo uma unidade de atividade enzimática definida como a quantidade de proteína capaz de causar um aumento de 0,005 unidades de absorbância por minuto a 450 nm.

3.5.4. Determinação da concentração de proteínas

A determinação da concentração de proteínas nas amostras foi analisada com os isolados positivos no item 3.5.1. e, com as amostras preparadas no item 3.5.2. O teste realizado com fluorimetria (Qubit 2.0, Life Technologies) foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

3.5.5 Perfil proteico

O teste de perfil proteico foi realizado com os isolados positivos no item 3.5.1. e com as amostras preparadas no item 3.5.2. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) de acordo com o método de Laemmli (1970). As amostras foram analisadas em condições não redutoras (sem 2-mercaptoetanol). Os géis foram corados com nitrato de prata (AgNO₃) (Blum *et al.*, 1987).

3.5.6 Atividade gelatinolítica

A atividade gelatinolítica também foi realizada com os isolados positivos no item 3.5.1. e, com as amostras preparadas no item 3.5.2. A atividade gelatinolítica foi determinada por zimografia (Antunes *et al.*, 2010). Foi preparado um gel de poliacrilamida a 12% (m/v) ao qual foram adicionados 200 µL de solução de gelatina a 0,1 g mL⁻¹ por 10 mL

de gel de corrida. As amostras foram diluídas 1:1 com tampão de amostra sem 2-mercaptoetanol e aquecidas a 55 °C por 2 a 3 min. Marcadores de massa molecular pré-coloridos foram usados como referência. A corrida eletroforética foi realizada e, ao final, o gel foi colocado em solução Triton X-100 a 2,5% (v/v) por 15 minutos à temperatura ambiente. O procedimento acima foi repetido mais uma vez e, em seguida, o Triton X-100 foi parcialmente removido, deixando 2-3 mL no tanque. Cem (100) mL de tampão revelador [Tris 50 mM; CaCl₂ 5 mM; 0,02% de NaN₃ (m/v); pH 8,8], foram adicionados e agitado por 15 minutos à temperatura ambiente e incubado a 37 °C por 16 h. Finalmente, o gel foi corado com Coomassie Blue R250.

3.5.7 Atividade colagenolítica

A atividade de colagenase foi realizada com uma amostra do isolado ITF33 positivo no item 3.5.1. e preparado no item 3.5.2. Esse teste quantitativo foi realizado utilizando azocolágeno como substrato, conforme descrito por Váchová e Moravcová (1993) e modificado por Antunes *et al.* (2010). As diluições seriadas (200 µL) das amostras foram incubadas com 50 µL de uma solução de azocolágeno a 5 mg mL⁻¹ dissolvida em tampão Tyrode (137 mM NaCl, 2,7 mM KCL, 0,42 mM NaH₂PO₄, 10 mM HEPES, Dextrose 5, 6 mM, 1 mM MgCl₂ e 2 mM CaCl₂, pH 7,4) por uma hora a 37 °C, tendo o cuidado de homogeneizar as amostras a cada 5 minutos durante o período de incubação. A reação foi parada colocando as misturas de reação em um banho de gelo e depois centrifugadas por 3 min a 5000g. A absorbância do sobrenadante foi medida a 540 nm. A atividade específica foi expressa em U/mg de amostra, sendo uma unidade de atividade enzimática definida como a quantidade da amostra capaz de gerar um aumento de 0,003 unidades de absorbância por minuto a 540 nm.

3.6. Atividade antimicrobiana

3.6.1 Teste por difusão em ágar: técnica do disco

Todos os isolados foram submetidos ao teste de atividade antimicrobiana em disco de papel. A atividade antimicrobiana foi testada utilizando ensaios biológicos em triplicata. Os microrganismos utilizados no teste foram as bactérias patogênicas humanas *Escherichia coli*, CBMAI 825: *Micrococcus luteus* (DSMZ 20030), CBMAI 489: *Pseudomonas aeruginosa* (CCT 13388), CBMAI 484: *Salmonella choleraesuis* e CBMAI 485: *Staphylococcus aureus* (CCT 2740). Para os testes foi utilizada a técnica de difusão em disco dos extratos obtidos dos isolados microbianos. As bactérias patogênicas foram crescidas a 37°C por 24 horas em meio NB. Com auxílio de um swab estéril, as bactérias patogênicas foram semeadas em placas de Petri contendo meio MH (Muller Hinton) de forma que as mesmas fossem espalhadas por toda a placa. Posteriormente foram inseridos discos papel filtro estéreis (Ø 6 mm), equidistantes, embebidos com 10 µL do extrato metabólito dos micro-organismos de indústria têxtil preparados seguindo a metodologia do item 3.2. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela formação e medida do halo de inibição das colônias patogênicas (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

3.6.2 Teste de Concentração Mínima Inibitória (MIC)

Os 9 isolados fúngicos e 5 isolados bacterianos considerados positivos no item 3.6.1 foram inoculados em frascos de Erlenmeyer de 50 mL contendo 30 mL de caldo malte a 2% para fungos, 30 mL de meio NB para bactérias, e incubados a 28 °C e 37° C, sob agitação mecânica (150 rpm) por 7 dias e 24h respectivamente. Após o crescimento das colônias, as culturas foram trituradas em equipamento *Polytron* e a fase aquosa extraída com diclorometano (3 x 30 ml). As fases orgânicas reunidas foram secas sobre sulfato de sódio anidro, filtradas e o solvente foi evaporado até à secura utilizando o equipamento rotaevaporador. Os extratos microbianos foram analisados quanto à atividade antimicrobiana contra as seguintes bactérias: *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* CBMAI 825,

Pseudomonas aeruginosa CBMAI 489, *Salmonella choleraesuis* CBMAI 484 e *Staphylococcus aureus* CBMAI 485.

O inóculo para os ensaios foi preparado diluindo a massa celular raspada em solução de NaCl a 0,85%, ajustada à escala de McFarland 0,5 e confirmada por leitura espectrofotométrica a 580 nm. As suspensões celulares foram finalmente diluídas para 104 UFC mL). Os testes de MIC foram realizados de acordo com Ellof (1998), utilizando o caldo Muëller-Hinton em uma placa de teste de cultura de Elisa (96 poços). As soluções estoque dos extratos microbianos foram diluídas e transferidas para o primeiro poço e foram realizadas diluições em série para obter concentrações na faixa de 1,0-0,016 mg mL⁻¹. O inóculo foi adicionado a todos os poços e as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A atividade antimicrobiana foi detectada pela adição de 20 µL da solução aquosa de TTC a 0,5% (cloreto de trifetil tetrazólio, Merck). A MIC foi definida como a menor concentração de extrato microbiano que inibiu o crescimento visível, conforme indicado pela coloração com TTC (as células mortas não são coradas com TTC) (SETTE *et al*, 2006).

3.7 Taxonomia Polifásica dos isolados de interesse biotecnológico

3.7.1 Caracterização morfológica

As células bacterianas foram crescidas em meios de cultivo NB em 24h de incubação a 37°C. Após o crescimento foi preparado o esfregaço em lâminas, onde uma pequena quantidade de células foi colocada para coloração e posterior identificação. A coloração de Gram foi realizada segundo o protocolo padrão disponibilizado pelo Ministério da Saúde (2001), utilizando os corantes, violeta-de-metila 1%, lugol 5%, álcool 95%, fucsina 0,2%. Para análise das morfologias fúngicas em microscópio, foi realizado microcultivo onde as lâminas foram preparadas com crescimento do fungo num período de 7 dias e posteriormente foram coradas com azul de metileno 20%.

3.7.2 Caracterização Molecular

3.7.2.1 Extração de DNA genômico

Esta etapa foi realizada em colaboração com a Dra Valeria Maia Merzel do DRM-CPQBA/UNICMAP – Campinas, SP.

Após o crescimento dos micro-organismos (meio de cultivo sólido NB e PDB para bactérias e fungos respectivamente) foram transferidas duas alçadas de cada isolado para microtubos de 2,0 mL contendo a solução para extração fenol (900 μ L) e uma pequena quantidade das esferas de vidro (*glass beads*) um tubo de 2,0 mL, as esferas foram colocadas até a marcação de 200 μ L). As amostras foram agitadas em vórtex a velocidade máxima por 2 minutos e em seguida incubada em banho-maria a 65°C durante 20 minutos. A preparação foi novamente levada para agitação em vórtex a velocidade máxima por 2 minutos e em seguida centrifugada a 16.000g por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante transferido ao novo microtubo de 2,0 mL. Foram adicionados 800 μ L de fenol, homogeneizado brevemente em vortex e centrifugado a 16.000g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então transferido para um novo microtubo de 2,0 mL, adicionado um volume de fenol (1:1) e homogeneizado brevemente em vórtex.

O microtubo foi então novamente centrifugado a 16.000g por mais 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido a um novo microtubo de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 600 μ L de isopropanol e homogeneizados (sem utilização do vortex) e incubados em freezer (-20°C) por 20 minutos. Repetiu-se o procedimento de centrifugação a 16.000g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Ao *pellet*, foram adicionados 100 μ L de etanol a 70% e o tubo foi invertido por algumas vezes. Foi realizada mais uma centrifugação a 16.000g por 2 minutos a 4°C e novamente o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi secado a temperatura ambiente e em seguida suspenso em 30 μ L água reagente para biologia molecular. O DNA extraído foi quantificado em gel de agarose a 0.8% em tampão TEB 1%, com uma voltagem de 100 durante 20 minutos. O gel corado brometo de etídio (0,25 μ g/mL) e visualizado em transluminador (AAMIR *et al*, 2015).

3.7.2.2 Reação de PCR e purificação dos *amplicons*

Os DNAs extraídos foram submetidos a ampliações (PCR). Foram preparadas soluções contendo 15,35 µL de H₂O reagente de biologia molecular, Solução Tampão *Taq* 2,5 µL, Solução de MgCl₂ 0,75 µL, *Primer forward* 0,5 µL, *Primer reverse* 0,5 µL, dNTP's 0,2 µL, *Taq* DNA-polimerase 0,2 µL e DNA genômico 5 µL somando um volume total de 25 µL. As amostras foram colocadas em termociclador nas seguintes condições: 1 ciclo inicial de 5 min à 95°C; 40 ciclos da sequência 30s/95°C – 30s/63°C – 60s/72°C; e 1 ciclo final de 10 min à 72°C.

Os amplicons foram purificados utilizando o kit de coluna GFX Gel Band Purification Kit, sendo novamente visualizados em gel de agarose a 0.8%. Após o preparo das reações os tubos de amostras em duplicata foram colocados em equipamento de Termociclador seguindo o procedimento descrito do equipamento (AAMIR *et al*, 2015).

3.7.3 Sequenciamento e análises filogenéticas

A reação de sequenciamento foi preparada com 2 µL de Tampão *Save Money*, 0,5 µL do *Primer* (5 µM), 1 µL do Big DYE (Life Technologies), 2 µL do DNA da amostra e 4,5 µL de Água reagente para biologia molecular.

Após a reação de sequenciamento, a precipitação foi realizada na mesma placa seguindo o protocolo. Adicionou-se 1 µL de EDTA (125 nM em cada poço e 1 µL de Acetado de Sódio (NaOAc 3 M) em cada poço, além de 25 µL de etanol 100% gelado. As amostras foram suspensas em 10 µL de formamida Hi-Di e cobertas com a septa, incubadas no termociclador a 95°C por 5 minutos. Após esse período as amostras foram colocadas em gelo por 3 minutos e a placa foi então colocada no equipamento de sequenciamento de DNA, onde foram seguidas as instruções descritas no equipamento e controladas pelo técnico responsável pelo aparelho.

As sequencias foram analisadas pelas regiões ITS1 / ITS2 que foram amplificadas com os iniciadores ITS1 (5'-CCGTAGGTGAACCTGCGG-3 ') e ITS4 (5'-

TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), para os isolados ITF29 e 33 (VITA-MARQUES *et al.*, 2008). Para os demais isolados fúngicos que apresentaram características morfológicas pertencentes ao gênero *Penicillium* e *Aspergillus*, foi utilizado o gene da β -tubulina. A região do gene da β -tubulina foi amplificada com os oligonucleotídeos Bt2-F (5'GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC 3') e Bt2-R (5'ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3') (JÚNIOR *et al.*, 2015).

Para as bactérias a identificação dos isolados e a construção de bibliotecas gênicas foram realizadas a partir da amplificação e sequenciamento de fragmentos de genes de RNAr 16S, com a utilização dos primers 10f (AGTTTGATCCTGGCTC) e 1100r (GGGTTGCGCTCGTTG) (BELGINI *et al.*, 2013). Os mesmos *primers* também foram utilizados nas reações de amplificação.

As sequências foram comparadas com os dados de sequência ITS1 / ITS2, B-tubulina e 10F 1100r de cepas disponíveis nos bancos de dados públicos Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando as rotinas de correspondência de sequência BLASTn. As sequências foram alinhadas pelo programa BioEdit e as análises evolutivas filogenéticas e moleculares foram realizadas usando o MEGA X.

O modelo de dois parâmetros Kimura foi utilizado para estimar a distância evolutiva. A reconstrução filogenética foi realizada usando o algoritmo de neighbor-joining (NJ), com valores de Bootstrap calculados a partir de 1.000 execuções replicadas, usando as rotinas de software incluídas no software MEGA X.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Reativação das células microbianas utilizadas no estudo

Os resultados das reativações dos 105 micro-organismos preservados (45 bactérias e 60 fungos) revelaram o crescimento de 34 bactérias e 28 fungos filamentosos, totalizando 59% (n= 62), dos micro-organismos isolados.

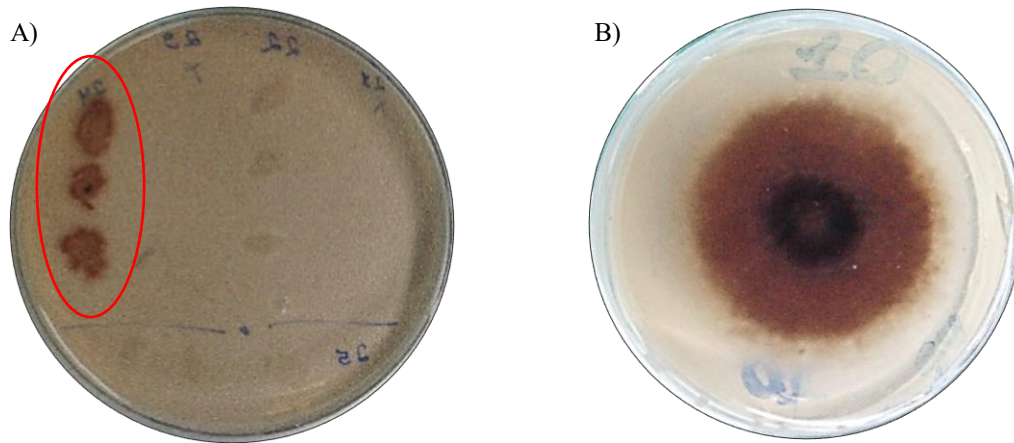
Dentre os 105 isolados microbianos coletados de um efluente industrial têxtil, apenas 62 foram reativados após a crioconservação, ao qual foram submetidos. Pode ser observado que houve um crescimento muito maior entre as bactérias, 75% dos 45 isolados bacterianos cresceram em meio de cultura. Os fungos obtiveram um crescimento inferior, representando 46% do total de isolados inicial. Desta forma, o método de conservação dos micro-organismos (-20 °C) pode não ter sido tão eficiente para manter todas as células viáveis após a reativação pois, as células microbianas podem ter sofrido injúrias metabólicas ao longo do processo de preservação (BATISTA *et al*, 2018).

4.2 Atividade enzimática

4.2.1 Triagem para produção de lacase e celulase

Os resultados dos experimentos realizados com todos os isolados bacterianos revelaram que apenas 01 bactéria, *Bacillus* sp. (ITB24), apresentou potencial para a produção da enzima lacase, quando colocado em meio de cultura contendo guaiacol, devido à formação de uma cor marrom da colônia bacteriana. As demais bactérias triadas (n= 33) não apresentaram putativa atividade enzimática para lacase através da metodologia aplicada. Isso pode estar relacionado ao fato de que grande parte das lacases produzidas por bactérias ocorre de forma intracelular (MARGOT *et al*, 2013). As colônias bacterianas escuras podem ser observadas no isolado *Bacillus* sp ITB24 e *Aspergillus sydowii* ITF10 apresentando halo escuro característico da produção de enzimas ligninolíticas, incluindo a lacase, em meio de cultivo com guaiacol (Figura 9).

Figura 9 – Isolados microbianos com atividade em placa contendo guaiacol.



A) *Bacillus* sp ITB24; B) *Aspergillus sydowii* ITF10

Dos 28 fungos filamentosos triados para a mesma atividade enzimática na presença de guaiacol, nove (9) apresentaram escurecimento e halos característicos, sendo selecionados como potenciais produtores da enzima lacase, no meio de cultura com guaiacol. Os fungos filamentosos com atividade positiva em guaiacol foram: *Penicillium* sp. (ITF3), *Penicillium rubens* (ITF4), *Aspergillus* sp. (ITF9), *Aspergillus sydowii* (ITF10), fungo não identificado (ITF13), *Aspergillus sydowii* (ITF27), *Aspergillus sydowii* (ITF30), *Aspergillus* sp. (ITF43) e *Aspergillus amoenus* (ITF47).

A oxidação com guaiacol é um dos ensaios qualitativos mais convenientes para a produção de enzimas ligninolíticas entre fungos (KAUR *et al*, 2016). Esta metodologia se mostrou eficiente na triagem de fungos e também bactérias com potencial produção de lacase deste estudo.

A produção de lacase por representantes do filo Proteobacteria provenientes de águas residuais foi estudada recentemente. É demonstrada sua atividade em placas contendo guaiacol por *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mendocina* e *Stenotrophomonas maltophila*. O ambiente das águas residuais é uma rica fonte de microorganismos com capacidade para a degradação de poluentes aromáticos e bactérias potencialmente produtoras de lacases (UNUOFIN *et al*, 2019).

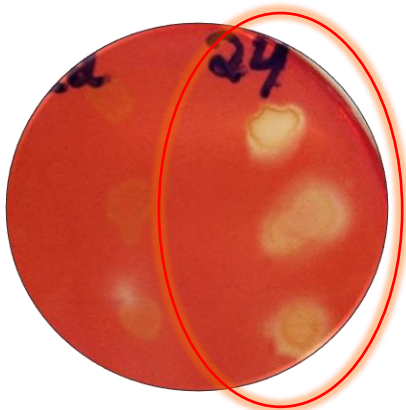
Vários estudos relatam a produção de lacase em meio de cultivo sólido contendo guaiacol por fungos isolados do solo, comprovando a efetividade deste substrato na seleção de cepas capazes de produzir lacases (PUNDIR *et al*, 2016; SUN *et al*, 2017; RAUACUTE *et al*, 2011). Outros estudos que também utilizam do guaiacol como ferramenta de detecção de micro-organismos produtores de lacase enfatizam aplicação da enzima para fins de bioremediação de águas residuais (ABDEL *et al*, 2016; MARGOT *et al*, 2013; MOHAMMED *et al*, 2019). Não foram encontrados estudos de produção de lacase por fungos ou bactérias provenientes de efluente de indústria têxtil.

Muitos produtos gerados por lacases são agentes antimicrobianos, desintoxicantes ou de cuidados pessoais ativos. Lacases provenientes de fungos e bactérias são de particular interesse em relação a potenciais aplicações industriais devido à sua capacidade de oxidar uma ampla gama de substratos relevantes (VISWANATH *et al*, 2014)

Alguns sistemas à base de lacase podem superar as desvantagens dos corantes químicos, substituindo o peróxido de hidrogênio como agente oxidante na fórmula de tingimento (UPADHYAY *et al*, 2016). Também já foram desenvolvidas preparações cosméticas e dermatológicas contendo lacases produzidas por micro-organismos para clareamento da pele (SHRADDHA *et al*, 2011).

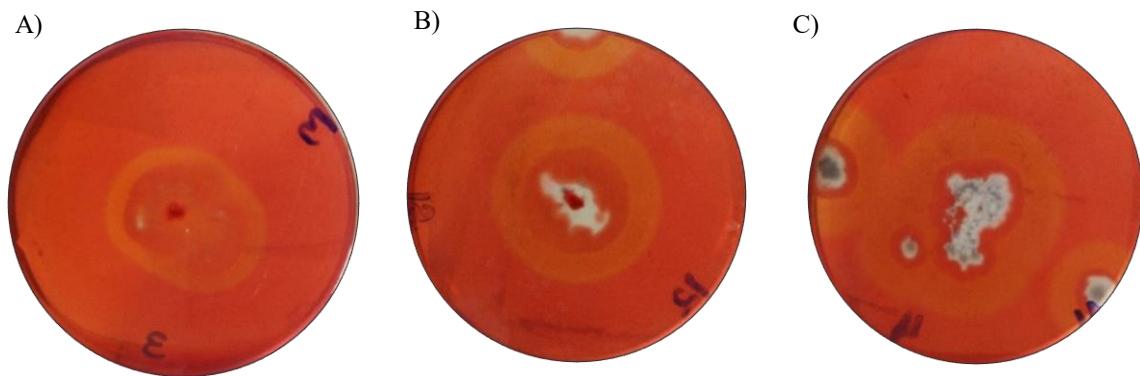
Para os testes de triagem de celulase, todos os micro-organismos foram submetidos ao meio de cultivo contendo CMC. Um total de 3 bactérias (ITB18 e 22 ambas não identificadas e ITB24 *Bacillus* sp.) apresentaram atividade positiva para celulase em placa através da formação de um halo de descoloração do corante vermelho Congo (Figura 10).

Figura 10 – Isolado *Bacillus* sp. (ITB24) apresentando descoloração em CMC.



Os 28 fungos filamentosos transferidos para o meio CMC apresentaram atividade positiva para celulase, formando halos de descoloração do corante Vermelho Congo em diferentes níveis. No total, 15 isolados apresentaram halos menores, considerado uma atividade discreta, sendo classificados com 01 sinal positivo (+), 6 apresentaram halos médios, sendo considerado com atividade mediana e classificados com 02 sinais positivos (++) e 7, uma atividade mais acentuada, sendo classificados com 03 sinais positivos (+++), com formação de halos maiores (Figura 11).

Figura 11 – Halos fúngicos de diferentes tamanhos em meios com CMC



Halos das colônias fúngicas classificados. A) ITF3 halos discretos (+), B) ITF12 halos medianos (++) e C) ITF4 halos acentuados (+++).

A coloração com vermelho do Congo tem sido amplamente utilizada em muitos estudos para o rastreamento de micro-organismos degradadores de celulose. Embora seja comprovado que o diâmetro da zona de hidrólise pode não refletir com precisão a atividade real da celulase de acordo com a concentração de enzimas (LIANG *et al*, 2014). Como tratou-se apenas de um teste de triagem, a metodologia aplicada se mostrou eficaz para classificação dos isolados com capacidades elevadas de produção da enzima através da formação de halos.

As águas residuais têxteis contêm uma variedade de compostos do processamento de produtos químicos, corantes, impurezas naturais extraídas, e resíduos de fibras de algodão (GEORGIU & AIVASIDIS, 2012). O algodão é uma das formas mais puras de celulose, quase 90% das fibras componentes são de celulose (HSIEH, 2007). A afinidade das celulases com o algodão depende do grau de cristalinidade, das condições dos

substratos e dos componentes da celulase presentes no sistema de reação (SARAVANAN *et al*, 2013). A presença desse tipo de fibra no efluente industrial têxtil pode ter facilitado e estimulado a produção enzimática de celulase pelos micro-organismos, visto que uma grande quantidade de isolados provenientes desse meio foi capaz de produzir a enzima.

Estudos realizados com bactérias provenientes de águas residuais relataram a produção de celulase por *Bacillus subtilis* em meios de cultivo contendo CMC como principal fonte de celulose (ZAMANI *et al*, 2018). Outro estudo com bactérias produtoras de celulase encontradas no solo contaminado com efluentes de indústria de celulose e papel relataram isolados apresentando atividade de celulase em meio de cultivo contendo CMC. Neste estudo, os isolados foram identificados como *Bacillus subtilis*, *Bacillus mojavensis* e *Bacillus cereus* (REDDY *et al*, 2017). Espécies de *Streptomyces* spp. também já foram relatadas como boas produtoras de celulase em meios contendo CMC (AMORE *et al*, 2012).

Fungos termofílicos isolados de amostras de solo também vêm sendo amplamente estudados para produção de celulases em meios de cultivo com CMC. O fungo *Aspergillus fumigatus* foi relatado como produtor de enzimas extracelulares para degradação de lignoceluloses, mostrando maior atividade para a celulase e a β -glucosidase (SAROJ & NARASIMHULU, 2018). *Trichoderma* e *Aspergillus* isolados de bananas em decomposição também foram relatados como produtores de celulases em placas de carboximetilcelulose-ágar vermelho do Congo (LEGODI *et al*, 2019).

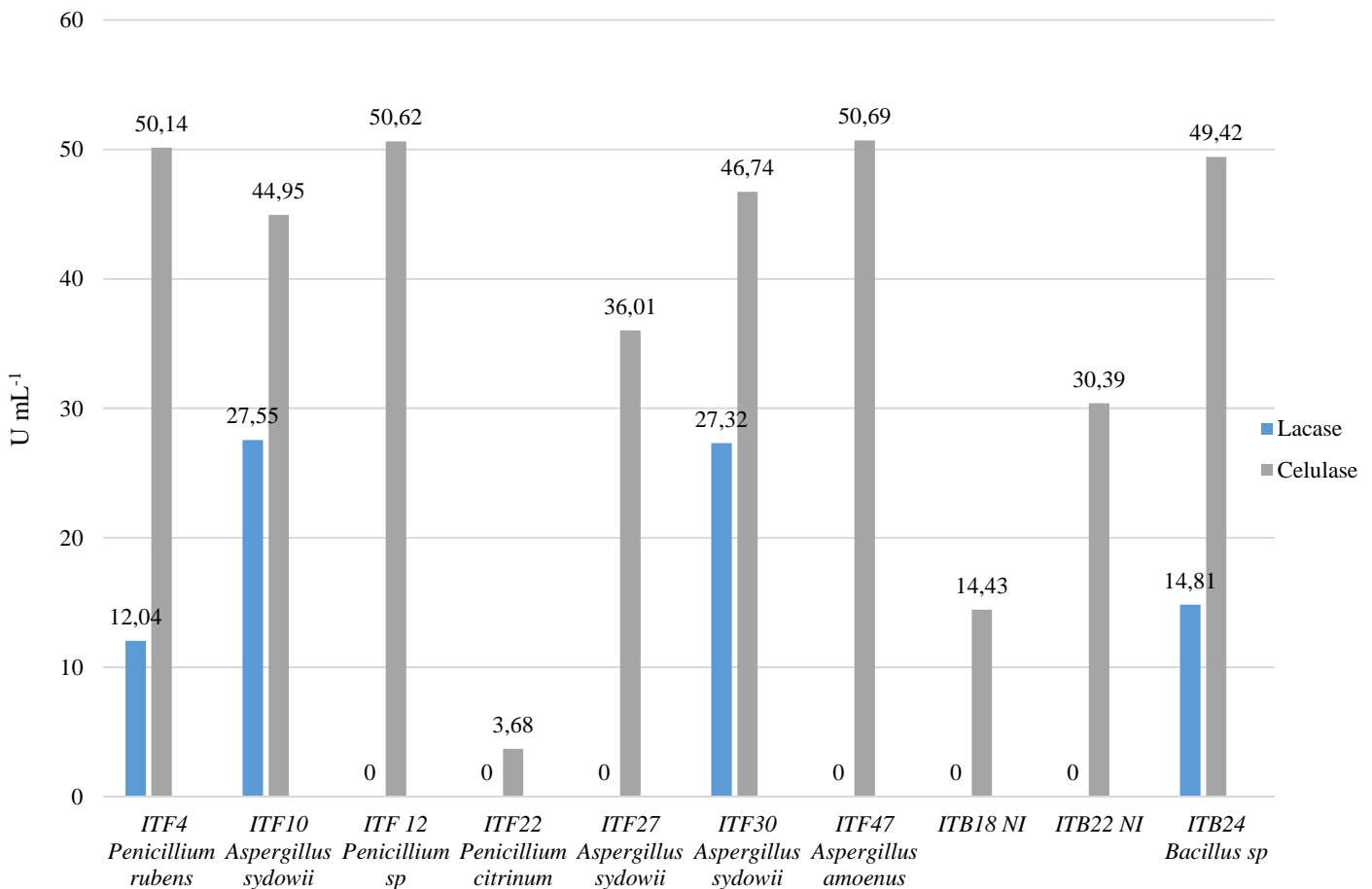
Os fungos são os principais micro-organismos produtores de celulase, alguns gêneros foram relatados como produtores de atividade celulolítica em meio de CMC como *Trichoderma* e *Aspergillus*. Porém, atividade de celulases de fungos e bactérias provenientes de ambientes aquáticos ainda é pouco estudado (NARENDHIRAKANNAN *et al*, 2014). Não foram encontrados estudos correlacionando a atividade enzimática de celulase de micro-organismos isolados de estações de tratamento de indústria têxtil.

Enzimas microbianas capazes de hidrolisar eficientemente a biomassa lignocelulósica são fundamentais para o desenvolvimento de um processo de bioconversão de celulose economicamente viável. Até agora, a baixa eficiência da hidrólise e o alto custo de produção das celulases continuam sendo os obstáculos significativos nesse processo e enfatizam a necessidade da busca de linhagens capazes de produzir estas enzimas de forma eficiente para aplicação na indústria do biocombustível (GAO *et al*, 2017).

4.2.2 Atividade enzimática de Lacase e Celulase

Os isolados microbianos com atividade considerada positiva para lacase com guaiacol foram testados frente a adição do substrato ABTS. Os resultados obtidos demonstraram que 3 fungos (ITF4; 10; 30) obtiveram atividade frente ao ABTS com valores variando entre 12.037 a 27.546 U mL⁻¹. O isolado bacteriano (ITB24) foi único que apresentou atividade quando colocado frente ao mesmo substrato (14,815 U mL⁻¹). Para o teste de atividade enzimática de celulase, três (03) isolados bacterianos produziram a enzima na faixa de 14.43 a 49.41 U mL⁻¹ sendo eles: ITB18; 22; 24. Com relação aos fungos, 7 isolados apresentaram atividade enzimática, sendo eles: (ITF 4; 10; 12; 22; 27; 30; 47) com variação enzimática de 36.11 a 50.69 U mL⁻¹ (Figura 12).

Figura 12 – Atividade de lacase e celulase dos isolados microbianos



Os isolados ITF3, 9 e 13 apresentaram coloração marrom em placa contendo o guaiacol mas suas atividades enzimáticas foram consideradas nulas no teste espectrofotométrico com ABTS.

O guaiacol é um composto fenólico com um grupo metoxi e é o éter monometílico do catecol, esse composto é facilmente oxidado pelo ferro heme das peroxidases, incluindo a peroxidase da enzima ciclooxigenase (IMURA *et al*, 2005). As peroxidases são oxidoreduções que oxidam substratos orgânicos, tendo o peróxido de hidrogênio como molécula receptora de elétrons (SINGH *et al*, 2019). Já o ABTS possui atividade nas oxidases que contenham núcleo de cobre, como é o caso das lacases (MORE *et al*, 2011). A melhor especificidade do ABTS sugere que os isolados ITF3, 9 e 13 são putativos produtores de peroxidases, o que justifica sua atividade em placa contendo apenas guaiacol como substrato.

Os isolados ITF10, 27 e 30 identificados como *Aspergillus sydowii*, apresentaram diferentes atividades enzimáticas. No caso da produção de lacase com ABTS como substrato, a diferença de atividade entre o ITF10 e 30 é de apenas 0,0002 U L⁻¹. Essa diferença de atividade segue baixa entre os dois fungos quando observada a atividade de celulase, sendo a diferença de 1,78 U mL⁻¹ entre eles. O isolado ITF27 apresentou suficiente atividade enzimática em placa de CMC para ser analisado em espectrofotômetro, porém há uma discrepância maior dele em relação aos isolados ITF10 e 30, chegando a uma diferença de 10,72 U mL⁻¹ entre ITF27 e ITF30. Diversos fatores podem ter influenciado essa atividade enzimática do ITF27 em relação aos outros dois isolados identificados como sendo da mesma espécie, desde a forma de armazenamento em laboratório até as condições de exposição ambiental de onde cada fungo foi isolado (DEMAIN, 2000).

Poucos fungos do gênero *Aspergillus* produtores de enzimas foram encontrados neste estudo em relação aos *Penicillium*. O fungo filamentosso *Aspergillus sydowii* geralmente causa podridão da madeira e exige um pouco mais de umidade, fator que ressalta as características preferenciais de seu habitat terrestre mais úmido ou aquático, com sua capacidade de produção de enzimas e degradação de carboidratos (MATKAR *et al*, 2013).

Recentemente, através de procedimentos de otimização de produção de enzima, o *Aspergillus sydowii* produtor de lacase (2.57 U mL⁻¹) foi constatado como eficiente biocatalisador catódico em célula de combustível microbiana de iluminação autossuficiente (ABDALLAH *et al*, 2019). Cepas desse mesmo fungo originárias da Antártica também foram

relatadas como bons produtores de lacase (CONG *et al*, 2017). *A. sydowii* foi relatado a partir de habitats terrestres e marinhos, e a maioria dos trabalhos com esse micro-organismo descreve principalmente sobre sua produção de enzimas lignolíticas (NAIR *et al*, 2010). Outro estudo verificou que o isolado *A. sydowii* é um potencial produtor de celulase β -glucosidase com boa atividade, podendo ser utilizado posteriormente para sacarificação na produção de açúcares fermentáveis e etanol (MATKAR *et al*, 2013).

Aspergillus sydowii também já foi descrito como um fungo filamentosso halotolerante e halófilo com propriedades interessantes na presença de altas concentrações de sal, em pH ácido ou em líquidos iônicos (GUNDE-CIMERMAN *et al*, 2009). Outro estudo conclui que o *A. sydowii* pode degradar o formaldeído de forma eficiente e pode ser utilizado com sucesso no tratamento de águas residuais industriais que contenham esse contaminante (YU *et al*, 2015).

O fungo ITF47 identificado como *Aspergillus amoenus* foi o melhor produtor de celulase deste estudo chegando a atividade enzimática de 50,69 U mL⁻¹. Pôde-se notar que essa espécie ainda é pouco estudada como produtora de metabólitos, além de pouco se saber sobre seu habitat (JURJEVIC *et al*, 2012). Estudos comprovam a produção de CMCase a partir da cepas recém-isoladas de *Aspergillus versicolor*, um grupo bastante próximo ao *Aspergillus amoenus*, através da otimização de diferentes parâmetros físico-químicos (QAISAR *et al*, 2014).

Outro fungo produtor de lacase e celulase encontrado no presente estudo, foi o ITF4 *Penicillium rubens*. Esse isolado obteve a menor atividade enzimática de lacase (12,04 U mL⁻¹), sendo até mesmo inferior a atividade encontrada na bactéria ITB24, porém foi um dos que obteve melhor atividade de celulase (50,14 U mL⁻¹) em relação aos outros isolados. Uma pesquisa com 19 espécies de *Penicilliums* isoladas em um levantamento de fungos produtores de enzimas extraídos de macroalgas ao longo da costa da ilha de Jeju, na Coréia, os autores constataram a produção de endoglucanase e β -glucosidase por *P. rubens* em altas quantidades, as cepas formaram halos de 5–10 mm para atividade de β -glucosidase (PARK *et al*, 2016).

O isolado ITF12 (*Penicillium* sp.) e o isolado ITF22 (*Penicillium citrinum*) obtiveram atividades enzimáticas para produção de celulase bastante distintas, chegando a uma variação de 46,94 U mL⁻¹. Espécies de *Penicillium* em geral têm sido relatadas como excelentes produtoras de enzimas celulolíticas quando comparadas a outras espécies e

linhagens comerciais. *Penicillium citrinum* apresenta um bom potencial para a produção dessas enzimas por ser considerado um produtor altamente sinérgico e constante (PIMENTEL *et al*, 2014).

Foi constatado que a produção de celulase pelo *Penicillium citrinum* chegou a 134 U mL⁻¹ em meio contendo glicose e 159 U mL⁻¹ em meio de cultivo com maltose, sendo seu pH de melhor atividade entre 5 e 6,5 (MUTHUKRISHNAN, 2017). Alguns autores também relataram que 30°C é a melhor temperatura para a produção de CMCase por *Penicillium citrinum* (ABDEL-FATAH *et al*, 2012). As cepas fúngicas isoladas de indústria têxtil foram submetidas à temperatura de 28°C, fator que também pode ser diferencial na produção enzimática. Diferente de alguns outros isolados identificados, *Penicillium citrinum* é mais estudado e sua produção de celulase é mais bem conhecida e caracterizada (OYEDEJI & OJEKUNLE, 2018).

Apesar do baixo número de isolados produtores de enzimas pode-se observar uma melhor atividade enzimática da bactéria ITB24, sendo capaz de produzir tanto lacase quanto a celulase em quantidades satisfatórias quando comparado aos resultados obtidos pelos isolados fúngicos. O isolado ITB24 identificado como *Bacillus* sp, foi o único que apresentou coloração marrom em meio de cultivo em placa contendo guaiacol. Em teste com ABTS o isolado apresentou atividade enzimática 14,81 U mL⁻¹ em espectrofotômetro, superior a atividade do isolado fúngico ITF4 *Penicillium rubens*, 12,04 U mL⁻¹.

A produção de lacases é afetada por muitos fatores, como composição do meio, tempo de cultivo, pH, temperatura e disponibilidade de carbono e nitrogênio (MUTHUKUMARASAMY *et al*, 2015). As lacases bacterianas costumam ter alta estabilidade a temperatura e pH elevados em comparação com as lacases de fungos (MARGOT *et al*, 2013). Além disso, as lacases bacterianas têm ampla especificidade de substrato e são econômicas, além do tempo reduzido de crescimento das colônias em relação aos fungos (SRINIVASAN *et al*, 2019). A existência de lacase em bactérias foi relatada em diversas espécies, com destaque para o gênero dos *Bacillus*, sendo alguns deles *B. halodurans*, *B. subtilis*, *Bacillus* sp. HR03, *Azospirillum lipoferum*, *B. pumilus*, *B. subtilis* WP1 e *Pseudomonas putida* (MUTHUKUMARASAMY *et al*, 2015).

As atividades enzimáticas de celulase produzida pelos três isolados bacterianos positivos apresentaram bons resultados quando comparados aos resultados obtidos pelos isolados fúngicos. As bactérias ITB18 e 22 apresentaram atividade 14,43 U

mL⁻¹ e 30,39 U mL⁻¹ respectivamente, enquanto o isolado de melhor atividade ITB24 identificado como *Bacillus* sp., apresentou uma atividade superior de 49,42 U mL⁻¹.

A maioria das celulasas é comumente obtida de fungos, mas as bactérias são consideradas importantes por causa de sua alta taxa de crescimento, produção de enzimas complexas eficazes e facilidade de engenharia genética para melhorar a produção enzimática. Entretanto, sabe-se que relativamente poucas linhagens de *Bacillus* utilizam formas cristalinas de celulose e produzem enzimas celulasas (THOMAS *et al*, 2018).

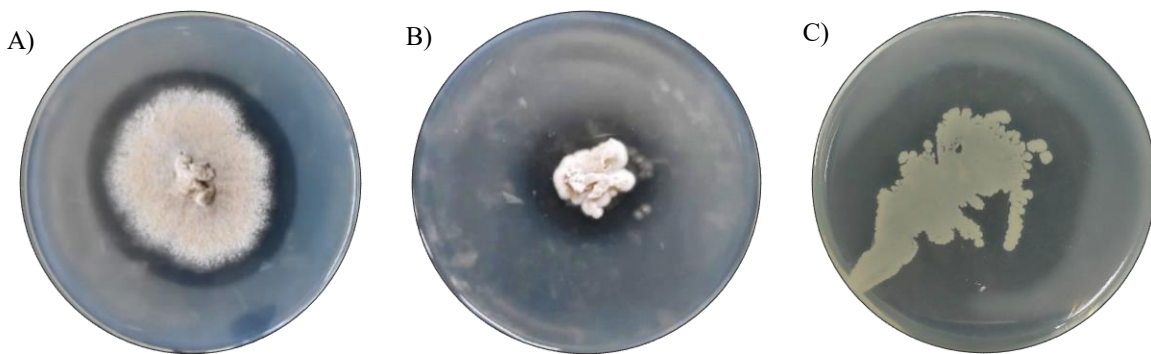
Outros trabalhos com bactérias isoladas do solo também revelaram boas produções enzimáticas por *Pseudomonas fulorescens*, *E. coli*, *Bacillus subtilis* e *Serratia marscens*. Propriedades celulolíticas de alguns gêneros bacterianos como *Cellulomonas*, *Cellovibrio*, *Pseudomonas*, *Sporocytophaga* spp., *Bacillus* e *Micrococcus* também foram relatados (SETHI *et al*, 2013). Testes revelaram que diversas cepas bacterianas produtoras de celulase podem ter sua atividade melhorada consideravelmente através de técnicas de otimização (ISLAM & ROY, 2018). Testes de otimização da atividade enzimática podem ser realizados para verificação dos melhores parâmetros para obtenção dessas enzimas, visto que um grande número de isolados foi capaz de produzir atividades significativas.

Tanto os isolados fúngicos quanto os isolados bacterianos foram testados apenas para verificação da produção enzimática de lacase e celulase sem nenhuma técnica de otimização sendo aplicada sobre esses micro-organismos. Entretanto, podemos dizer que os micro-organismos isolados do efluente industrial têxtil, possuem um potencial para produção dessas enzimas. Mesmo com os bons resultados relatados na literatura sobre a produção de celulase e lacase por fungos dos gêneros e espécies encontrados neste trabalho, pouco ainda se sabe sobre a produção enzimática desses micro-organismos quando isolados de fontes diferenciadas, como a estação de tratamento de indústria têxtil e como esses ambientes influenciam nas funções metabólicas desses grupos microbianos.

4.2.3 Triagem para atividade proteolítica

Todos os micro-organismos foram submetidos a triagem da produção de proteases através da formação de halos em placas contendo meio de cultivo acrescido de 10% de leite desnatado. Como realizado para o teste da celulase em meio CMC, utilizamos os mesmos parâmetros para diferenciar os isolados positivos: halos discretos e menores (+), halos medianos (++) e halos acentuados e maiores (+++) (Figura 13).

Figura 13 – Halos acentuados e maiores (+++) de produção de proteases



A) ITF13 (não identificado); B) ITF33 (*Sarocladium* sp.); C) ITB40 (*Bacillus* sp.).

Houve uma melhor produção de halos proteolíticos em placas por 4 isolados fúngicos (ITF13, 14, 33 e 34) e 4 isolados bacterianos (ITB35, 40, 43 e 47). A produção de protease em meio contendo leite como fonte de caseína pode ser considerado um método eficaz apenas como triagem, pois existem grandes possibilidades de gerar falsos positivos e falsos negativos. Micro-organismos podem produzir ácidos ou hidrolases glicosídicas que também são capazes de formar halos em meios de cultivo contendo leite (JONES *et al*, 2007). A utilização do leite como fonte de caseína se mostrou bastante eficaz na triagem de micro-organismos produtores de protease neste estudo. Os halos apresentados foram bem característicos e permitiram a seleção de isolados de interesse para testes mais específicos da produção dessa enzima.

Bactérias provenientes de águas residuais de curtumes foram relatadas como produtoras de proteases em placas contendo leite como fonte de proteínas, produzindo halos

de atividade. A protease encontrada era altamente estável até pH 8,0, a atividade enzimática máxima era alcançada a uma temperatura de 50 °C e a enzima ainda era ativa na presença de íons como Ca^{2+} , Na^{+} e Mg^{2+} (ALMALKI *et al*, 2017). Alguns desses íons são relatados presentes também em efluente de indústria têxtil (HOLKAR *et al*, 2016).

Pesquisas estão voltadas à produção de proteases alcalinas que possam suportar condições adversas a fim de que possam ser aplicadas na produção de produtos na área de saúde (FURHAN *et al*, 2014). Isto sugere a necessidade de pesquisa de novas fontes microbianas para produção de protease com propriedades diversas.

Estudos realizados com *Bacillus subtilis* halotolerante, demonstrou a produção de enzimas proteolíticas em placas contendo leite e reforçou a aplicabilidade do gênero *Bacillus* para produção de enzimas proteolíticas e seu uso no setor industrial (ALI *et al*, 2016). Diversos fungos produtores de enzimas proteolíticas vêm sendo estudados. O fungo *Beauveria felina* foi relatado como um produtor de protease alcalina, *Aspergillus flavus* como produtor de serino proteases, *Aspergillus foetidus* produtor de protease ácida, *Purpureocillium lilacinum* e *Aspergillus parasiticus* como produtor de protease com atividade queratinolítica (SOUZA *et al*, 2015; YADAV *et al*, 2015; CAVELLO *et al*, 2013). Os crescentes estudos enfatizam o potencial das produções de enzimas proteolíticas produzidas por fungos capazes de atingir atividades com diversas características diferenciadas (ANITHA *et al*, 2013). Um estudo sobre a produção de enzimas evidenciou a atividade enzimática do *Sarocladium zeae* para proteases em placas com leite como uma das mais relevantes (ABE *et al*, 2015).

Um estudo com 98 fungos endofíticos isolados de *Piper hispidum* demonstraram que 28 deles produziram atividade enzimática em placas contendo leite como fonte de proteínas, chegando a halos de até 16,40 mm de diâmetro produzidos pelos fungos *Phoma herbarum* e *Schizophyllum commune* (ORLANDELLI *et al*, 2015). Outros estudos também verificaram a produção de proteases em placas com meio de cultivo contendo leite por *Trichoderma reesei* e *Aspergillus flavus* (QIAN *et al*, 2019; MUTHULAKSHMI *et al*, 2011). Os resultados obtidos denotam a capacidade dos micro-organismos de demonstrarem sua atividade proteolítica em meios de cultivo contendo leite como fonte de caseína.

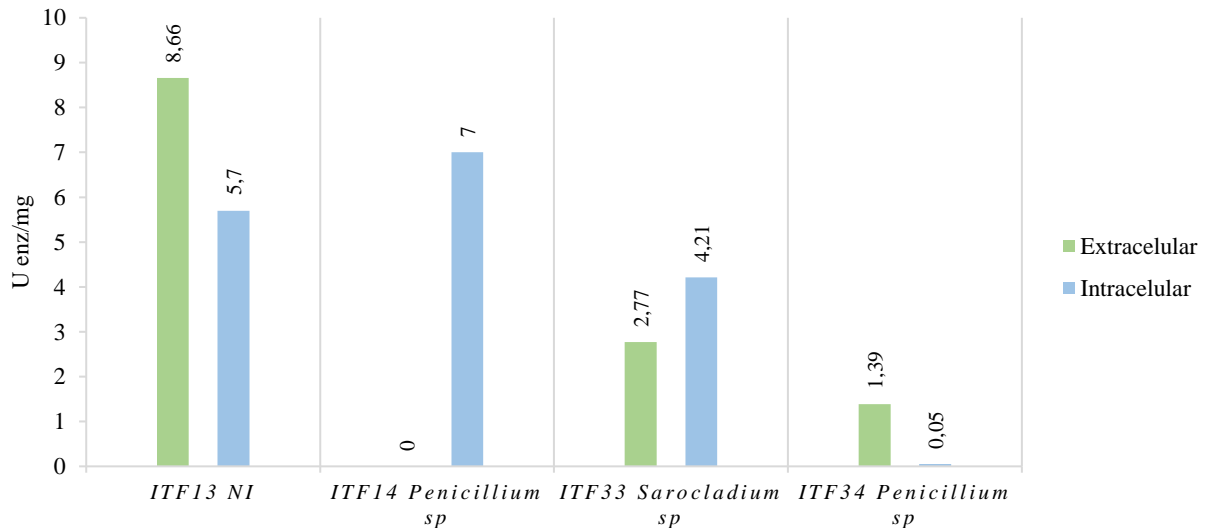
A produção de proteases com linhagens microbianas provenientes de ambientes diferenciados, como efluentes industriais, não é tão explorado. Não foram encontradas pesquisas de triagem de fungos ou bactérias produtoras de proteases em meio de

cultivo ágar-leite, isolados em condições ambientais adversas similares as características inerentes ao efluente industrial têxtil.

4.2.4 Atividade azocaseinolítica

Os ensaios de atividade azocaseinolítica foram realizados dos os melhores produtores de halos na triagem para atividade proteolítica com leite desnatado. Esses isolados foram submetidos a testes de quantificação de proteínas e atividade proteolítica com azocaseína para verificação tanto da produção específica enzimática de protease extracelular quanto intracelular. Através dos resultados obtidos podemos observar a variação da atividade enzimática específica dos isolados apresentados na Figura 14.

Figura 14 – Atividade azocaseinolítica específica dos fungos



A variação da atividade de protease extracelular foi de 8,66 U enz/mg do maior produtor (ITF13), para menor produtor (ITF34). Já a variação da produção de proteases intracelular foi de apenas 2,79 U enz/mg, entre o maior produtor (ITF14) e o menor produtor da enzima (ITF34). O ITF14 não obteve produção de protease pela metodologia realizada.

O isolado ITF13 obteve o melhor resultado para produção de protease extracelular. A diferença entre a produção extracelular para intracelular foi de apenas 2,96 U enz/mg desse isolado. Já a atividade enzimática específica intracelular o isolado ITF14 *Penicillium* sp., obteve o melhor resultado dentre os fungos 7,00 U enz/mg e o mesmo não apresentou atividade extracelular de protease.

Através da metodologia utilizada, o ITF14 não foi capaz de apresentar atividade enzimática extracelular de protease, o que se contrapõe ao fato desse fungo ter apresentado halo proteolítico em placa contendo leite. A formação do halo pode ter acontecido devido a uma indução á produção da enzima pela presença de outros componentes no leite. Micro-organismos podem produzir ácidos ou hidrolases glicosídicas que também são capazes de formar halos nesses meios de cultivo (JONES *et al*, 2007).

A produção de protease microbiana é principalmente extracelular e é fortemente influenciada por fatores nutricionais e físico-químicos como temperatura, pH, fontes de nitrogênio e carbono, sais inorgânicos, agitação e concentração de oxigênio dissolvido (KUDDUS & RAMTEKE, 2008). Cada tipo de micro-organismos apresenta seus próprios requisitos para obter a máxima produção de enzimas. É relatado que as condições de cultura que induzam a produção de protease são diferentes das condições de cultura que promovem o crescimento celular (KASANA *et al*, 2011).

Embora a maioria das proteases comerciais sejam produzidas por *Bacillus*, os fungos também exibem uma variedade interessante de proteases. Além disso, os fungos são geralmente considerados linhagens seguras na produção de proteases extracelulares, com destaque para os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus* (CHANDRASEKARAN *et al*, 2015).

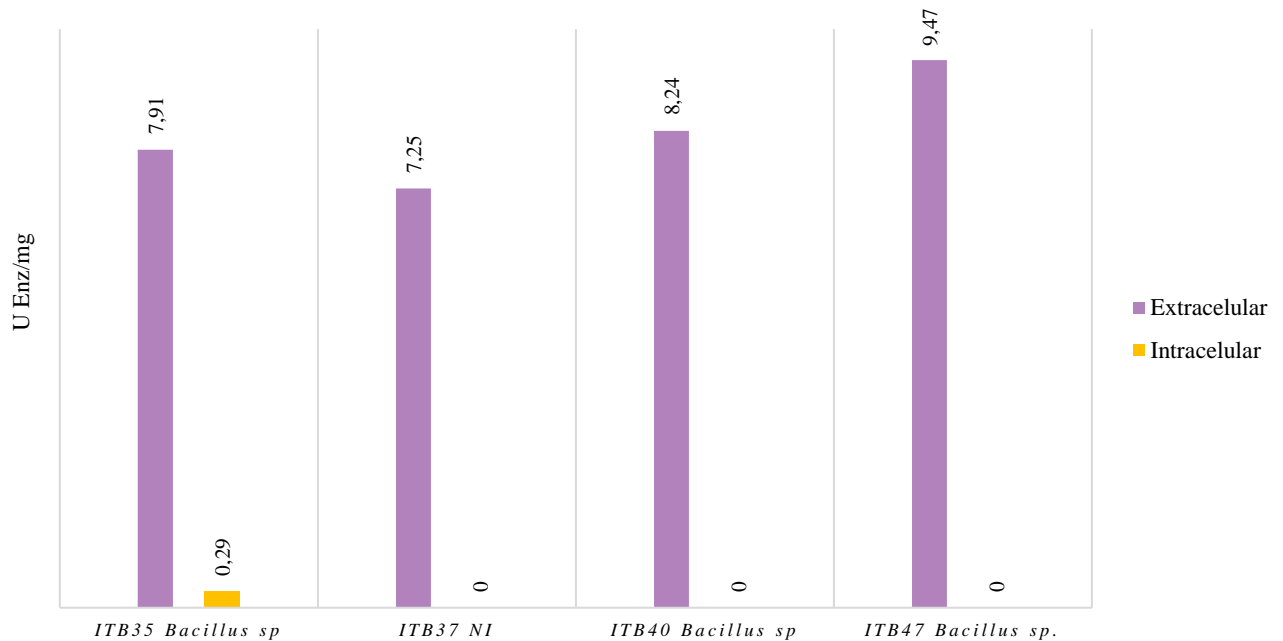
As espécies de *Penicillium* têm um grande potencial biotecnológico para a produção de proteases. Estes incluem *Penicillium* sp., *P. camemberti*, *P. citrinum*, *P. griseoroseum*, *P. restitum* e *P. roqueforti*. As espécies de *Penicillium* atraem a atenção para a produção de proteases alcalinas sob diferentes condições ambientais (SOUZA *et al*, 2015). Apesar de citado como produtor de protease, *P. citrinum* isolado de efluente de indústria têxtil não foi capaz de produzir essa enzima através das metodologias empregadas no presente estudo.

O isolado ITF33 (*Sarocladium* sp.) obteve boas atividades enzimáticas tanto intracelular como extracelular, havendo apenas uma produção superior a nível intracelular. Alguns fungos desse gênero como o *Sarocladium strictum*, foi descrito como produtor de serino-proteases patogênicas a plantas, principalmente morangos. A proteólise desempenha um papel importante em diferentes funções fisiológicas, como processamento de proteínas pós-secreção, germinação, esporulação, formação de micélio aéreo, nutrição e adaptação a diferentes condições ambientais (CHANDRASEKARAN *et al*, 2016).

Fungos da espécie *Sarocladium oryzae* emergiram como uma grande ameaça para a produção de arroz em ecossistemas de cultivo de arroz no mundo e também infectam outras importantes culturas de cereais, como milho. Linhagens virulentas deste fungo conhecidas por secretarem proteinases em níveis significativamente mais altos em comparação com linhagens menos virulentas, indicam os possíveis papéis das proteinases fúngicas na patogenicidade das plantas (HITTALMANI *et al*, 2016). Foram encontrados níveis mais elevados de produção de protease intracelular entre os fungos, exceto o isolado ITF34, que apresentou uma atividade de 0,05 U enz/mg. As proteases intracelulares são importantes para vários processos celulares e metabólicos, como esporulação e diferenciação, renovação de proteínas, maturação de enzimas e hormônios e manutenção das próprias proteínas celulares (SOUZA *et al*, 2015).

Ao que diz respeito às atividades proteolíticas das bactérias isoladas da indústria têxtil (Figura 15), pode-se observar que as atividades enzimáticas específicas extracelulares apresentaram níveis mais elevados que os fungos e com valores bem próximos entre si. Os isolados ITF35 e 40 (*Bacillus* spp.) apresentaram atividades enzimáticas bastante próximas (7,91 e 8,24 U enz/mg). ITB47 *Bacillus* sp. apresentou a atividade mais elevada (9,47 U enz/mg) e ITF37 que não foi identificado, apresentou a menor atividade (7,91 U enz/mg). Houve uma produção enzimática intracelular discreta apenas pelo isolado ITF35 (0,287 U enz/mg).

Figura 15 – Atividade azocaseinolítica específica das bactérias



O gênero *Bacillus* é amplamente conhecido por sua produção de proteases extracelulares. Diversas espécies de *Bacillus* isoladas já foram exploradas por suas proteases alcalinas (RODARTE *et al*, 2011). As bactérias pertencentes a esse gênero são consideradas melhores fontes de protease estudadas atualmente, exibem ampla especificidade ao substrato, atividade enzimática significativa, estabilidade, fácil purificação, curto período de fermentação e baixo custo. Algumas espécies conhecidas de *Bacillus* envolvidas na produção de protease são *B. sterothermophilus*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. mojavensis* e *B. subtilis* (SANTHI, 2014). *Bacillus cereus* é uma das bactérias mais amplamente utilizadas na produção de produtos químicos específicos e enzimas industriais além de uma importante fonte de protease (UMAYAPARVATHI *et al*, 2013). Proteases produzidas por *Bacillus cereus* já foram caracterizadas de diversos ambientes terrestres e aquáticos (MIENDA, 2013).

Um estudo sobre proteases de *Bacillus* provenientes de água potável de diferentes distritos revelou que uma quantidade maior de enzima era produzida através da manutenção dos parâmetros ligados à estabilidade térmica, alcalina e oxidante, tornando esses micro-organismos atrativos para aplicações industriais (CHANDRA *et al*, 2019). Nos estudos realizados com os isolados de amostra têxtil revelaram apenas a produção enzimática desses isolados sem qualquer tratamento ou melhoramento enzimático. Seriam necessários outros

testes para verificar a melhor faixa de pH e temperatura, além do tempo de melhor produção enzimática para saber a real eficiência dessas enzimas produzidas.

Outro estudo sobre a produção de proteases pela espécie *Bacillus luteus* demonstrou que a atividade enzimática acontecia em uma ampla faixa de pH e temperaturas, com um pH ótimo de 10,5 e uma temperatura de 45°C. Devido à sua tolerância à alta salinidade e alcalinidade, bem como à sua estabilidade contra alguns solventes orgânicos, surfactantes e oxidantes haviam boas perspectivas para aplicação industrial da protease proveniente dessa espécie de *Bacillus* (KALWASIŃSKA & JANKIEWICZ, 2018). Pode-se notar que as enzimas proteolíticas de fontes bacterianas no presente estudo, apresentaram uma maior atividade e maior estabilidade. Entre os fungos, houve grandes variações nas produções extracelulares de protease, porém a atividade enzimática intracelular, foi observada em todos os isolados, enquanto nas bactérias apenas uma apresentou atividade intracelular de protease detectada pela metodologia utilizada.

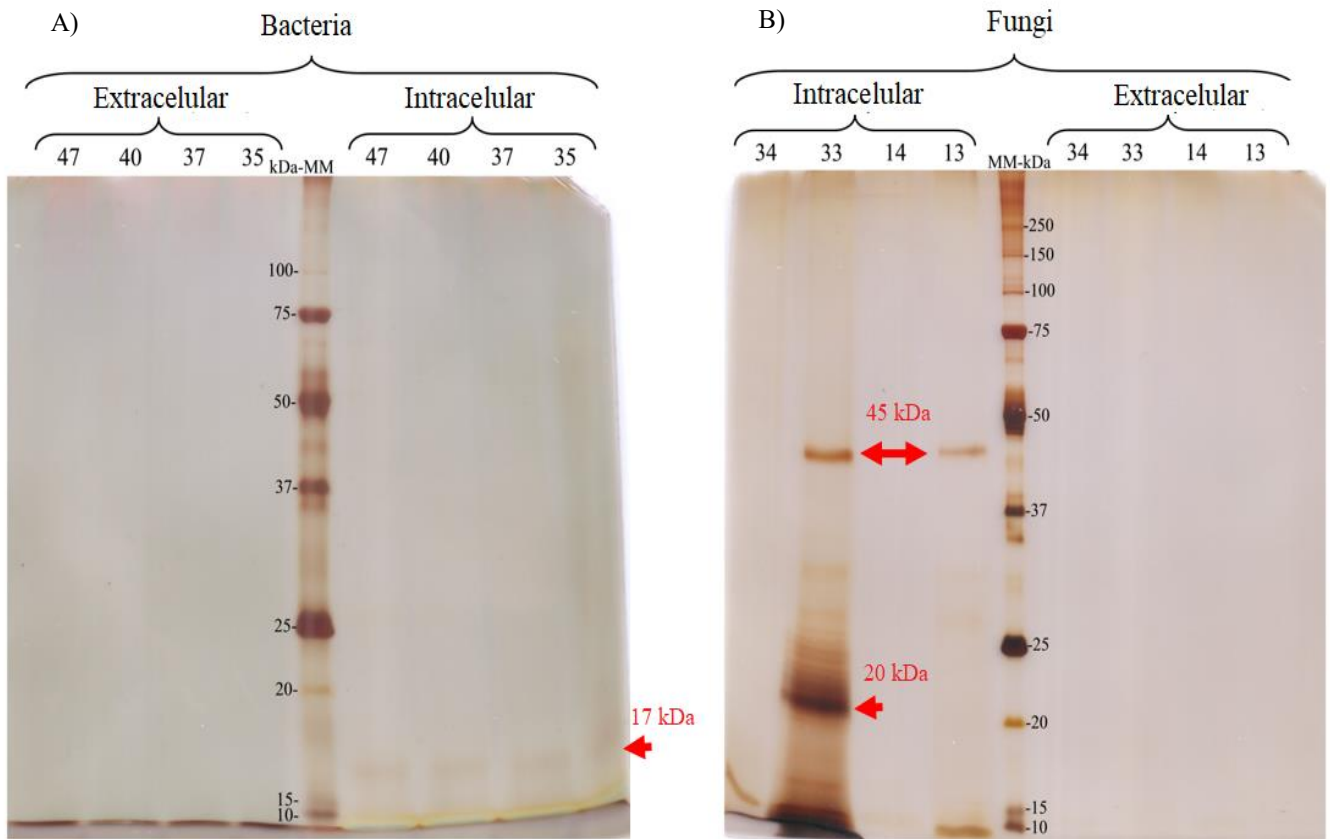
Tanto a protease produzida de forma intracelular quanto a extracelular possuem atividades proteolíticas altamente controladas. Porém, o reconhecimento do substrato pelas proteases intracelulares é altamente seletivo, o que é atribuído à atividade reguladora da expressão de proteínas celulares e outras enzimas (DOUGAN *et al*, 2013).

Muitos estudos destacam o uso das proteases provenientes de micro-organismos para processos de biorremediação de águas residuais, biobranqueamento para indústrias têxteis e tratamento de água de esgoto com lodo ativado (ABRAR & HAMZA, 2017; RATHOD & PATHAK, 2018; SINGH & BAJAJ, 2017).

4.2.5 Perfil proteico dos micro-organismos produtores de protease

Os experimentos para verificação do perfil de proteínas foram realizados com os isolados selecionados para produção de protease sendo 4 fungos (ITF13, 14, 33 e 34) e 4 bactérias (ITB35, 37, 40 e 47). As amostras foram as mesmas utilizadas no teste de atividade enzimática específica (Intra e Extracelular) e demonstraram o perfil das proteínas presentes nas amostras dos isolados (Figura16).

Figura 16 – Perfil proteico dos isolados produtores de proteases



As setas indicam onde houve o aparecimento de bandas referentes ao tamanho das proteínas presentes nas amostras. A) isolados bacterianos; B) isolados fúngicos.

As amostras de extração de proteínas revelaram proteínas de peso molecular próximas a 15kDa dos 4 isolados bacterianos (ITB35, 37, 40 e 47). As bandas claras formadas a partir das análises das extrações das proteínas bacterianas (Figura 16A), mostram uma presença discreta de proteases de peso molecular em torno de 17 kDa. Pesquisas relataram os pesos moleculares relativos das proteases alcalinas bacterianas na faixa de 15,0 a 45,0 kDa (SHAIKH *et al*, 2018). Em um estudo sobre produção de proteases pela bactéria *Corynebacterium alkanolyticum* isolada do intestino distal de um peixe de água doce, foi verificada proteases de peso molecular 17 kDa (BANERJEE *et al*, 2017).

Para os fungos, as amostras de extração de proteínas revelaram quantidades significativas de proteínas na composição das amostras do isolado ITF13 e ITF33. O isolado ITF13 apresentou bandas de perfil proteico próximo a 50 kDa e 10 kDa. O perfil proteico do isolado ITF33 (*Sarocladium* sp.) revelou bandas bem demarcadas de proteínas com pesos

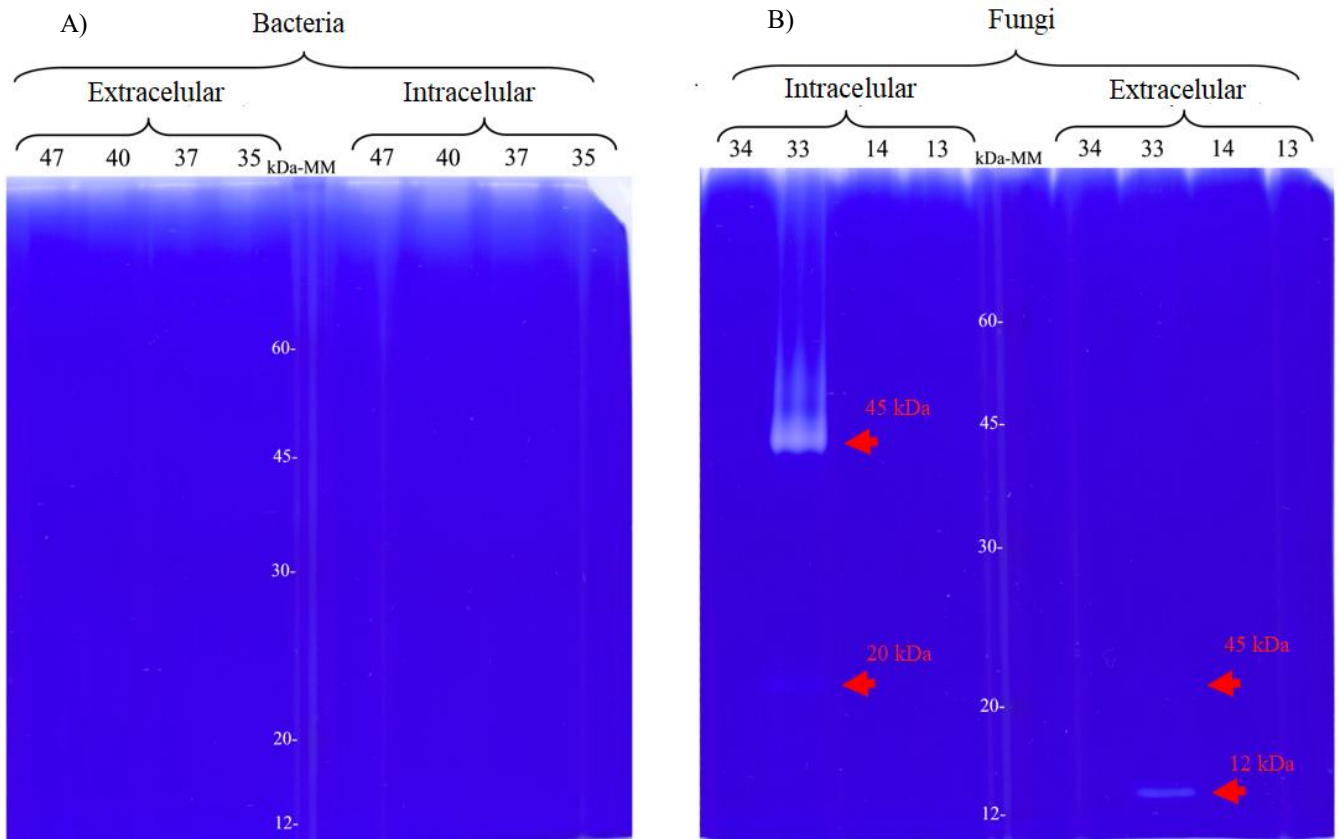
moleculares próximas a 10 kDa, 20 kDa e 50 kDa (Figura 16B). A baixa massa molecular exibida pelas proteases encontradas nos isolados corroboram com outros trabalhos que relatam proteases fúngicas com peso molecular menor que 50 kDa (SOUTO *et al*, 2019; ZANPHORLIN *et al*, 2011).

A faixa entre 30 a 45 kDa também pode representar proteases ácidas, que são endopeptidases com massas moleculares nessa faixa e que dependem de resíduos de ácidos para sua atividade catalítica, além de mostrarem atividade máxima em pH baixo (VISHWANATHA *et al*, 2009). As proteases aspárticas microbianas podem ser amplamente divididas em dois grupos: enzimas do tipo pepsina produzidas por *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Neurospora* e enzimas do tipo renina produzidas por *Endothia* e *Mucor* spp. (KULKARNI *et al*, 1999).

4.2.6 Atividade Gelatinolítica

A atividade gelatinolítica foi realizada com os mesmos isolados submetidos ao teste de verificação do perfil proteico. Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 17 e apresentam o isolado ITF33 *Sarocladium* sp. como único positivo nesta metodologia. Nenhuma das proteínas bacterianas detectadas pelo gel de poliacrilamida apresentaram atividade gelatinolítica na zimografia. As proteínas do ITF13, 14 e 34 não apresentaram atividade gelatinolítica aparente por esta metodologia (Figura17).

Figura 17 – Atividade gelatinolítica dos isolados produtores de protease



As setas indicam formação de bandas de atividade em gel pelo ITF33 (*Sarocladium* sp.). A) isolados bacterianos; B) isolados fúngicos.

Na amostra submetida a extração de proteínas, o isolado ITF33 (*Sarocladium* sp.) apresentou banda bastante demarcada de peso molecular próximo a 45 kDa e outra mais discreta próxima a 20 kDa. Já nas amostras de extrato enzimático, esse isolado apresentou bandas discretas próximas a 20 kDa e 12 kDa.

Pode-se observar que a proteína intracelular do IT33 *Sarocladium* sp. de peso molecular próximo a 45 kDa apresentou boa atividade gelatinolítica. A proteína próxima a 20 kDa, apesar de sua abundância (Figura 17), a atividade gelatinolítica foi discreta.

A amostra extracelular do fungo IT33 *Sarocladium* sp., também apresentou atividade gelatinolítica, uma banda próxima a 12 kDa e outra próxima a 20kDa sugerindo a presença da mesma enzima tanto intracelular quanto extracelular, porem nesta segunda condição em abundancia muito menor, o que pode não ter permitido a visualização da proteína no gel de poliacrilamida.

Proteases fúngicas com peso molecular próximas de 45 kDa geralmente são apontadas como metaloproteases, e as de bandas próximas a 20 kDa são classificadas como serinoproteases (PETERSON *et al*, 2011). Estudos sugerem que a proteína de 45 kDa produzida por fungos são quitinases que já foram identificadas sendo produzidas principalmente por *Paracoccidioides brasiliensis* (BORGES *et al*, 2010; PERON *et al*, 2017; SANTANA *et al*, 2012).

A zimografia de gelatina é um método simples, confiável e sensível que é comumente usado para monitorar a expressão e a ativação da gelatinase em uma variedade de amostras biológicas (células, tecidos e líquidos) (SILVA, *et al*, 2014). A capacidade inerente das gelatinases de hidrolisar eficientemente o colágeno I desnaturado (também conhecido como gelatina) é a base para a detecção dessas enzimas por zimografia em gelatina (REN *et al*, 2017).

As gelatinases são membros da família matriz das metaloproteinases (MMP) de endopeptidases dependentes de zinco. São enzimas proteolíticas que degradam vários componentes da matriz extracelular, desempenham um papel na remodelação dos tecidos e essas enzimas têm sido consistentemente demonstradas como associadas à progressão do câncer (JUCÁ *et al*, 2008).

Muitos estudos demonstraram que a expressão e a atividade das gelatinases são elevadas em tumores malignos humanos e, na maioria dos casos, esses parâmetros mostraram correlação com a angiogênese tumoral e a progressão do câncer (DERYUGINA *et al*, 2006; MATOS *et al*, 2012). Grande parte da pesquisa em biologia do câncer concentra-se em fatores que modulam o fenótipo maligno *in vitro* e *in vivo*. Isso geralmente inclui ensaios para monitorar a expressão, ativação e atividade das gelatinases e seu efeito correspondente no fenótipo maligno (TOTH *et al*, 2012).

As metaloproteinases já foram relatadas sendo produzidas por *Candida* e desempenham um papel na degradação dos componentes da matriz extracelular subendotelial, facilitando a migração da levedura nos tecidos após o cruzamento da camada endotelial, permitindo a invasão fúngica dos órgãos-alvo (SOUZA *et al*, 2016; YUAN *et al*, 2009).

A produção de metaloproteases foi considerada como fator de virulência em bactérias *Citrobacter rodentium*, responsáveis por causar doenças intestinais inflamatórias e

também contribuem para a cascata inflamatória no líquido cefalorraquidiano durante a meningite bacteriana (SAVONIUS *et al*, 2019; RODRIGUES *et al*, 2012).

Embora necessário para a homeostase do tecido em condições fisiológicas normais, a desregulação de metaloproteinasas foi encontrada em muitos estados de doença, como desenvolvimento e sobrevivência do câncer, crescimento tumoral metastático, angiogênese, invasão, modulação da resposta imune e degradação patológica dos componentes da matriz extracelular, como colágeno. O uso dessas proteases em aplicações clínicas, como isolamento celular ou engenharia de tecidos não foi explorado (KNAPINSKA *et al*, 2017).

Os poucos usos das proteases aprovadas pela FDA (Food and Drug Administration) são limitadas a aplicações em acidente vascular cerebral, infarto agudo do miocárdio, espasmos musculares, sepse, sangramento traumático e distúrbios digestivos e de coagulação do sangue (CRAIK *et al*, 2011). A maioria das proteases comercializadas são serina-proteases, exceto a neurotoxina botulínica (Botox®) e *Clostridium histolyticum* collagenase, que são metaloproteases (HONIG, 2014).

O perfil de proteínas produtoras de proteases e gelatinases de fungos do gênero *Sarocladium* não são amplamente conhecidas ainda. De modo geral, o perfil de proteases fúngicas ainda é pouco estudado e não foram evidenciados estudos de atividade gelatinolítica de micro-organismos provenientes de efluentes de indústria têxtil.

4.2.7 Atividade colagenolítica

Após o resultado obtido com a atividade gelatinolítica, o teste de atividade de collagenase foi aplicado apenas com isolado ITF33 (*Sarocladium* sp.). O teste foi realizado com amostras de proteínas intracelulares extraídas e extrato enzimático microbiano extracelular. A atividade específica colagenolítica mostrou valores de 7,62 e 9,04 U / mg para as amostras intracelular e extracelular do ITF33, respectivamente. É a primeira vez que é reportada atividade de collagenase de um fungo do gênero do *Sarocladium*.

As collagenases bacterianas são amplamente estudadas e melhores caracterizadas. No caso das bactérias essas enzimas são metaloproteinasas envolvidas na

degradação das matrizes extracelulares das células animais, devido à sua capacidade de digerir o colágeno nativo. As proteases são importantes fatores de virulência em uma variedade de bactérias patogênicas (DUARTE *et al*, 2016).

As colagenases microbianas têm sido empregadas diretamente na terapia clínica para o desbridamento de queimaduras, cicatrização de feridas, retenção de placenta, hérnia de disco lombar, tratamento de oclusão total crônica e aprimoramento da terapia genética de câncer mediada por adenovírus ou terapia eletrogenética (PAL & SURESH, 2016).

Um estudo com 27 micro-organismos produtores de colagenase isolados de amostras de solo de esgoto de um mercado de peixes demonstrou uma atividade de colagenase por *Pseudomonas* de 0,17 U mL⁻¹ (GAUTAM & AZMI, 2017). Produção de colagenases por duas cepas diferentes de fungos *Aspergillus awamori* foram relatadas como dependentes de ambiente proteico alcalino para ser ativo, chegando a uma produção de 8 U mL⁻¹ (BLIEVA *et al*, 2018).

Um artigo de revisão recente reuniu 21 trabalhos relacionados à produção de colagenases por fungos. Apenas 4 artigos foram publicados nos últimos 5 anos, dois desses estudos relataram enzimas com alta especificidade ao colágeno. Entre os micro-organismos estudados, *Penicillium aurantiogriseum* (231 U mL⁻¹) e *Rhizoctonia solani* (212,3 U mL⁻¹) destacaram-se na atividade da colagenase produzindo enzima de forma extracelular em boas quantidades. O estudo enfatiza uma lacuna na literatura pela falta de pesquisa sobre a produção de colagenase por fungos e sua caracterização, o que impede um maior desenvolvimento na área e aumenta a necessidade de mais estudos (WANDERLEY *et al*, 2017).

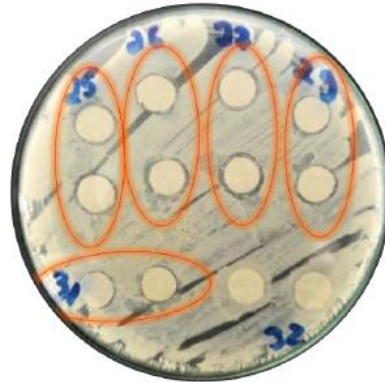
4.3 Produção de metabólitos antimicrobianos

4.3.1 Atividade antimicrobiana por técnica de disco

Todos os isolados provenientes do efluente da indústria têxtil foram testados para produção de metabólitos antimicrobianos. Para este teste, foi utilizada a técnica de difusão em disco dos extratos obtidos dos isolados microbianos contra as bactérias

patogênicas. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela formação do halo de inibição das colônias patogênicas (Figura 18).

Figura 18 – Formação de halos de inibição da *Escherichia coli* ao redor do disco com extrato das bactérias ITB25; 26; 27; 29 e 31



Um total de 9 fungos e 14 bactérias apresentaram atividade antimicrobiana em placa através da formação de halos de inibição. A identificação desses isolados permitiu verificar que houve produção antimicrobiana por todos os gêneros de fungos identificados neste estudo, sendo 4 *Aspergillus* (3 da espécie *A. sydowii* ITF10, 27 e 30, e 1 *A. amoenus* ITF47), 2 *Penicillium* spp. (ITF21 e 28), 1 *Trichoderma harzianum* (ITF29) e 1 *Sarocladium* sp. (ITF33), um fungo não foi identificado (ITF13). Dos isolados bacterianos, apenas o gênero *Bacillus* foi identificado sendo eles 4 *Bacillus* spp. (ITF24, 35, 40, 43 e 47).

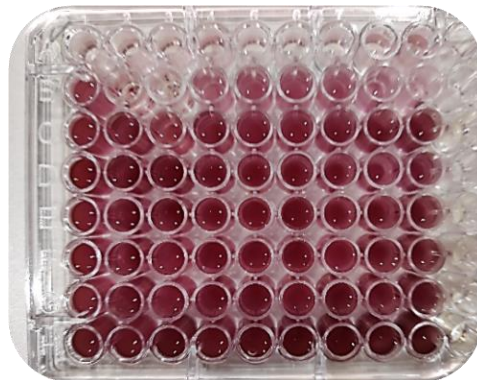
Os halos formados pelos micro-organismos foram discretos, por esta razão não foram classificados em diferentes níveis. Todos os positivos com halos visíveis foram selecionados para o teste mais específico de concentração mínima inibitória (MIC).

O ensaio de difusão em disco fornece resultados qualitativos ao categorizar metabólitos com potencial antimicrobiano. No entanto, como a inibição do crescimento bacteriano não significa a morte bacteriana, esse método não pode distinguir efeitos bactericidas e bacteriostáticos. Apesar disso, esse ensaio de difusão em disco oferece muitas vantagens sobre outros métodos como simplicidade, baixo custo, capacidade de testar um grande número de micro-organismos e agentes antimicrobianos e a facilidade de interpretar os resultados fornecidos (BALOUIRI *et al*, 2016).

4.3.2 Concentração Mínima Inibitória (MIC)

Os isolados que apresentaram formação de halos para atividade antimicrobiana em placa foram então analisados quanto a Mínima Concentração capaz de inibir o crescimento das bactérias patogênicas testadas. O MIC foi definido como a menor concentração de extrato microbiano que inibiu o crescimento visível, conforme indicado pela coloração com TTC. Através da Figura 19 pode-se visualizar os resultados obtidos contra a bactéria patogênica *Pseudomonas aeruginosa*, onde a intensidade do corante representa a presença de células bacterianas crescidas. Onde não houve ligação do corante às células, não houve crescimento bacteriano patogênico.

Figura 19 – Resultados do teste de MIC contra a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*



Todos os 9 isolados fúngicos apresentaram inibição contra as bactérias patogênicas em diferentes níveis e apenas 2 bactérias (ITB43 e 47) apresentaram atividade no teste de MIC. Os resultados dos valores de MIC obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Mínima Concentração Inibitória dos extratos de fungos e bactérias em mg mL⁻¹.

| Isolados | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Micrococcus</i> sp. | <i>Salmonella choleraesuis</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
|------------------------------------|-------------------------------|------------------------|--------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| ITF10 <i>Aspergillus sydowii</i> | 1 | 1 | 1 | 1 | - |
| ITF13 NI | 0,5 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| ITF21 <i>Penicillium</i> sp | 1 | 1 | 1 | 1 | - |
| ITF27 <i>Aspergillus</i> sp | 0,5 | 1 | 0,5 | 0,25 | - |
| ITF28 <i>Penicillium</i> sp | 1 | 1 | 1 | 0,06 | 1 |
| ITF29 <i>Trichoderma harzianum</i> | 1 | - | 1 | 0,12 | - |
| ITF30 <i>Aspergillus sydowii</i> | 1 | 1 | 1 | 0,03 | - |
| ITF33 <i>Sarocladium</i> sp | 1 | 1 | 0,5 | 1 | - |
| ITF47 <i>Aspergillus amoenus</i> | 0,25 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 1 |
| ITB24 <i>Bacillus</i> sp | - | - | - | - | - |
| ITB35 <i>Bacillus</i> sp | - | - | - | - | - |
| ITB40 <i>Bacillus</i> sp | - | - | - | - | - |
| ITB43 <i>Bacillus</i> sp | - | 1 | - | - | - |
| ITB47 <i>Bacillus</i> sp | 1 | 0,5 | 1 | - | 1 |

Através dos dados apresentados na tabela foi constatado 3 isolados (ITF13 não identificado, ITF28 *Penicillium* sp e ITF47 *Aspergillus amoenus*) capazes de inibir todas as 5 bactérias patogênicas testadas no MIC. Este fator ressalta a atividade antimicrobiana de amplo espectro por esses fungos, uma vez que são capazes de inibir o crescimento tanto de bactérias gram-positivas (*Micrococcus* sp. e *S. aureus*) quanto gram-negativas (*P. aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *E. coli*).

Todos os fungos testados apresentaram boa atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, chegando a inibição na concentração mínima de 0,03 mg mL⁻¹ pelo ITF30 (*Aspergillus sydowii*). Um estudo com *Aspergillus sydowii* isolado de água do mar revelou uma atividade antimicrobiana em MIC de 0,002 mg mL⁻¹ contra a *E.coli* (LIU *et al*, 2019). Contra o crescimento de *Staphylococcus aureus*, apenas 3 isolados (ITF13 não identificado, ITF28 *Penicillium* sp. e ITF47 *Aspergillus amoenus*) apresentaram inibição em concentrações mínimas de 1 mg mL⁻¹.

Os fungos ITF10, 27 e 30 *Aspergillus sydowii* apresentaram diferentes atividades antimicrobianas. Enquanto o ITF10 apresentou atividade mínima inibitória de 1 mg mL⁻¹ contra quatro bactérias patogênicas exceto contra o *Staphylococcus aureus*, o ITF27

apresentou atividade em concentrações de 0,25 mg mL⁻¹ contra *E.coli* e o isolado ITF30 obteve a menor concentração deste estudo contra a mesma bactéria patogênica, chegando ao valor de 0,03 mg mL⁻¹ capaz de inibir o crescimento da *E.coli*.

Estudos relatam a produção de antimicrobianos contra *E.coli* e *Staphylococcus aureus* por linhagens de *Aspergillus sydowii* provenientes de esponjas marinhas (WANG *et al*, 2014; WIDYANINGSIH *et al*, 2018). *Aspergillus sydowii* foi relatado principalmente a partir de fontes marinhas e produz metabólitos secundários únicos e biologicamente ativos de interesse em diversos setores (WANG *et al*, 2014).

Não foram encontrados estudos correlacionando a atividade antimicrobiana de linhagens de *Aspergillus sydowii* proveniente de águas de resíduos industriais. Os três isolados dessa espécie tiveram considerável diferença em suas atividades antimicrobianas e esses fatores podem decorrer do ambiente ao qual foram retirados, das condições de conservação do laboratório que podem ter alterado características inerentes a capacidade de produção de metabólitos pelos isolados, que também se mostrou alterada em relação produção enzimática, ou também pode se tratar de linhagens diferentes com características próprias.

O isolado ITF47 *Aspergillus amoenus* apresentou boa atividade antimicrobiana contra todas as bactérias patogênicas testadas, chegando a 0,25 mg mL⁻¹ de concentração capaz de inibir o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa*. Contra o *Micrococcus* sp, *Salmonella choleraesuis* e *E. coli* esse isolado fúngico obteve resultados de 0,5 mg mL⁻¹ de concentração com atividade antimicrobiana e contra *Staphylococcus aureus*, sua atividade foi em concentração de 1 mg mL⁻¹. É a primeira vez que a atividade antimicrobiana do *Aspergillus amoenus* proveniente de efluente de indústria têxtil é relatada. Esse isolado obteve bons resultados de inibição contra as bactérias patogênicas testadas e através de estudos mais detalhados de isolamento e purificação do composto com efeito antimicrobiano, o mesmo poderá ser um potencial produtor de antibióticos.

O isolado fúngico ITF13 não pode ser identificado morfológicamente, mas também obteve atividade antimicrobiana contra todas as bactérias patogênicas testadas, chegando a inibição da *Pseudomonas aeruginosa* em concentrações de 0,5 mg mL⁻¹.

Apenas dois *Penicillium* (ITF21 e ITF28) tiveram atividade antimicrobiana. Os isolados identificados como *Penicillium* spp. também atingiram boas atividades antimicrobianas contra as bactérias testadas. O isolado ITF28 conseguiu atingir a

concentração de 0,06 mg mL⁻¹ de inibição da *E.coli* e contra as demais bactérias sua concentração de inibição também não foi menor que 1 mg mL⁻¹

Espécies de *Penicillium* têm uma alta diversificação, tanto morfológica quanto de metabólitos secundário, a exemplo de antibióticos, micotoxinas, antioxidantes, anticancerígenos, inseticidas, herbicidas, enzimas e fungicidas. Existe um grande número de *Penicillium* com propriedades antimicrobiana, sobretudo de espécies de *P. brevicompactum*, *P. carneus*, *P. citrinum*, *P. crhysogenum*, *P. dipodomys*, *P. flavigenum*, *P. funiculosum*, *P. griseofulvio*, *P. nalgiovense*, *P. nordicum*, *P. persicinum* são espécies relatadas como fontes de penicilina e griseofulvina (SILVA *et al*, 2010). A atividade antimicrobiana de *Penicillium* isolados de águas residuais da indústria têxtil também não é amplamente conhecida.

O isolado ITF29 *Trichoderma harzianum* apresentou atividade antimicrobiana apenas contra as bactérias gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis* e *E.coli*), revelando uma maior especificidade dos metabólitos produzidos. Diferentes atividades registradas sugeriram que o *T. harzianum* pode produzir diferentes metabólitos de interesse, sob diferentes condições ambientais. Este fungo é relatado como uma rica fonte de compostos antibacterianos que podem ser agentes promissores contra bactérias patogênicas agrícolas e médicas (ANWAR & IQBAL, 2017).

Quanto as atividades das 5 bactérias testadas, apenas 2 apresentaram atividade no teste de MIC. A bactéria ITB43 *Bacillus* sp. apresentou atividade antimicrobiana apenas contra o *Micrococcus* sp., em concentração de 1 mg mL⁻¹, enquanto os isolados ITB24, 35 e 40 (*Bacillus* sp.) não apresentaram atividade antimicrobiana detectada pelo MIC. O isolado bacteriano com melhor atividade foi o ITB47 *Bacillus* sp, que se mostrou capaz de inibir *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus aureus* na concentração de 1 mg mL⁻¹ e *Micrococcus* sp. em concentração de 0,5 mg mL⁻¹. Este isolado bacteriano não apresentou atividade contra a *E.coli* testada.

Pesquisas indicaram que aproximadamente 5% do genoma da maioria das espécies de *Bacillus* codifica para a síntese de compostos antimicrobianos (NDLOVU *et al*, 2017). Em geral, uma propriedade funcional vital atribuída às linhagens de *Bacillus* é a capacidade de produzir diferentes tipos de compostos antimicrobianos com amplo espectro de atividade contra bactérias e fungos. As espécies de *Bacillus* são capazes de produzir diferentes tipos de metabólitos que são estáveis ao longo de uma ampla faixa de pH e temperatura (OZABOR & FADAHUNSI, 2019).

Um estudo mais antigo caracterizou uma substância antimicrobiana produzida por uma linhagem de *B. cereus*, com amplo espectro de atividade e potencial para ser aplicado como agente de controle contra bactérias patogênicas (RISOEN *et al*, 2004). Outro estudo destacou a produção de metabólitos pelo *B. cereus* ativos contra um amplo espectro de bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* multirresistente (MDRSA), *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina (VRE) e até *Streptomyces* (WANG *et al*, 2014).

Poucos estudos recentes avaliam a atividade antibiótica de bactérias do grupo *B.cereus* (próximo ao *Bacillus* sp ITB47) e não foram encontrados estudos relacionando esta atividade metabólica com isolados provenientes de ambientes diferenciados, como o de águas residuais industriais têxteis. As propriedades inerentes a essas bactérias justificam sua capacidade de presença em ambientes diferenciados, como no caso da estação de tratamento de indústria têxtil.

Para evitar o surgimento da resistência microbiana e maximizar a eficácia dos tratamentos, novas terapias devem impactar em vários alvos celulares, enfatizando a importância dos antimicrobianos de amplo espectro. Enquanto a resistência aos antibióticos tradicionais pode surgir através da alteração de apenas um único resíduo de aminoácido, a resistência se torna menos provável quando uma série de processos é direcionado, contra os micro-organismos patogênicos (MEIR *et al*, 2017).

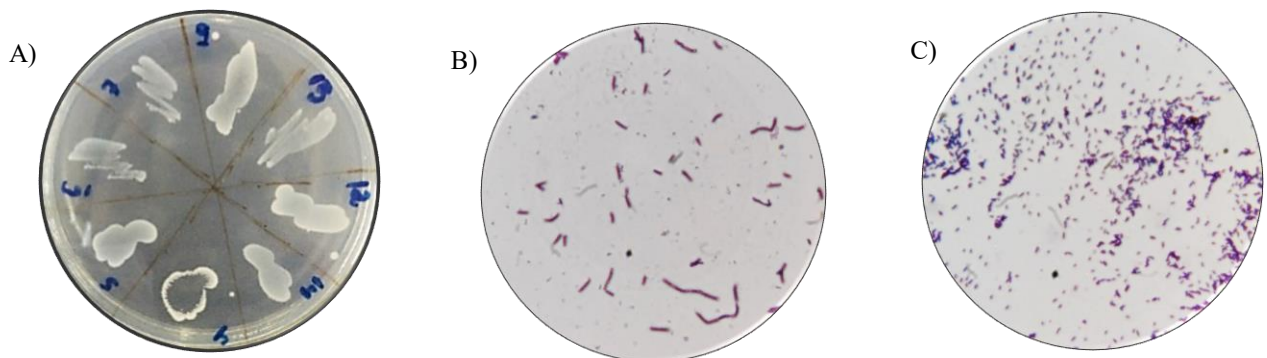
Linhagens microbianas multirresistentes estão se tornando mais comuns nas últimas décadas, e isso está relacionado ao uso extensivo de agentes antimicrobianos comercializados. Esse cenário levou a um aumento na busca de novas fontes de compostos com atividade antimicrobiana (LIMA *et al*, 2018). A atividade antimicrobiana dos isolados provenientes do efluente da indústria têxtil se mostrou promissora para aplicações farmacológicas contra importantes bactérias patogênicas clínicas

4.4 Taxonomia polifásica

4.4.1 Caracterização morfológica (Macroscópica e Microscópica)

As características morfológicas dos isolados foram observadas de acordo com a cor e o tamanho da colônia bacteriana. A técnica de Gram foi realizada para observação das estruturas dos isolados bacterianos que obtiveram resultados promissores nos testes realizados durante a pesquisa. Através do Gram pode ser observado, principalmente, um grande número de *Bacillus* spp., representados na figura 20.


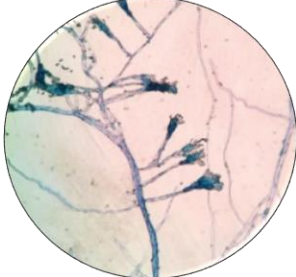
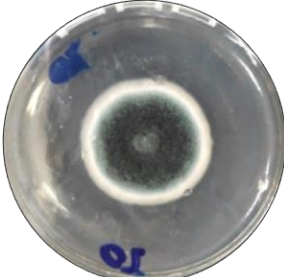
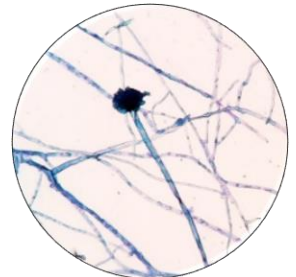

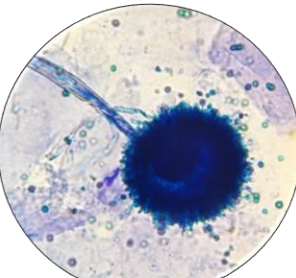
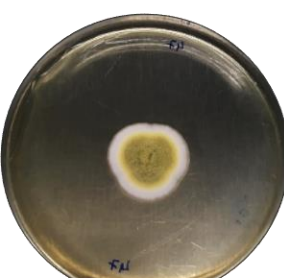
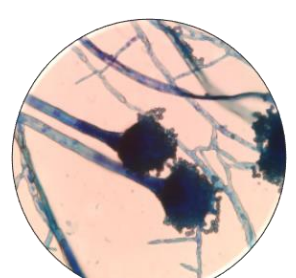
Figura 20 – Macro e Microscopia das bactérias de indústria têxtil



A) Características macroscópica de crescimento das bactérias; B) Microscopia. Objetiva100x ITB35 *Bacillus* sp. Gram +; C) Objetiva100x ITB24 *Bacillus* sp. Gram +

A observação da morfológica macroscópica dos fungos foi realizada através da observação das cores dos micélios e do tamanho do crescimento das colônias. O microcultivo foi realizado com os fungos que apresentaram resultados positivos nos testes realizados. Através da técnica, foi possível identificar principalmente fungos representantes dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. A Tabela 4 demonstram alguns dos isolados identificados através do microcultivo.

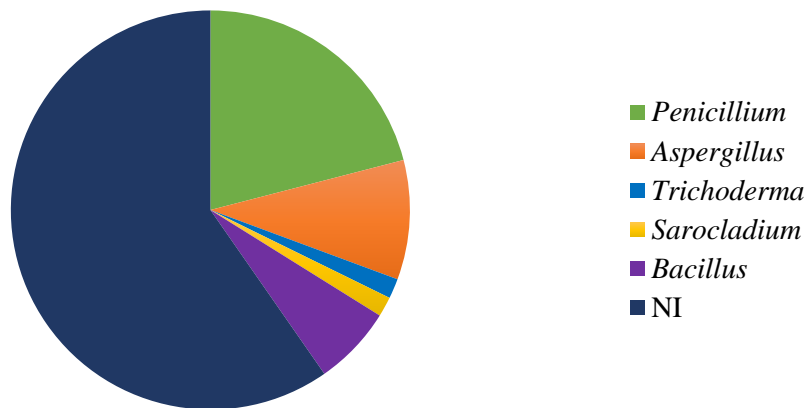
Tabela 4 – Características morfológicas microscópica e macroscópicas dos fungos

| Gênero identificado | Características morfológicas macroscópicas | Características morfológicas microscópicas |
|-----------------------------|---|--|
| ITF4 <i>Penicillium</i> |  |  |
| ITF10 <i>Aspergillus</i> |  |  |
| ITF43 <i>Aspergillus</i> |  |  |
| ITF47 <i>Aspergillus</i> |  |  |

Após avaliação macro e microscópica de todos os isolados estudados, foi possível identificar os gêneros: *Penicillium* (n= 13), *Aspergillus* (n=6), *Trichoderma* (n= 1), *Sarocladium* (n=1) e 7 fungos filamentosos não identificados. Com relação as bactérias avaliadas, foram identificadas apenas o gênero *Bacillus* (n=5), enquanto outras 30 bactérias

não foram identificadas (Figura 21). Os isolados identificados somam um total de 26 microorganismos.

Figura 21 – Isolados microbianos de interesse biotecnológico identificados



A microflora das águas residuais é tão variada quanto a composição dos próprios poluentes desse tipo de ambiente (KORZENIEWSKA *et al*, 2009). Poucas pesquisas tratam de caracterizar as comunidades microbianas que se proliferam em águas residuais de efluentes industriais têxteis. Devido ao crescimento da utilização de metodologias referentes a tratamento biológico utilizando lodo ativado, as pesquisas giram em torno de caracterização das comunidades capazes de realizar a degradação dos poluentes despejados pela indústria e poucas pesquisas se voltam para o entendimento da microflora que já habita esses locais (ZHANG *et al*, 2018).

Pesquisas recentes sobre a composição de fungos em estações de tratamento de águas residuais industriais apontaram alguns gêneros mais raros presentes e que podem ser potencialmente utilizados em biorremediação, entre eles, *Trichoderma*, *Acremonium*, *Talaromyces*, *Cladophialophora* e *Saccharomyces*. Por outro lado, gêneros cujos membros são mais comuns e conhecidos por serem patogênicos para humanos e plantas, como *Olpidium*, *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Rhodotorula*, *Penicillium*, *Candida*, *Synchytrium*, *Phyllosticta* e *Mucor*, também foram detectados na maioria das estações de tratamento industriais (ASSRESS *et al*, 2019). Os gêneros dos fungos filamentosos identificados no presente estudo constam nessa lista, com exceção do *Sarocladium*, que é um gênero de características próximas ao *Acremonium*.

O gênero *Penicillium* tem sido relatado em diferentes habitats, incluindo ambientes com condições extremas (pH alto ou baixo, salinidade variada, temperaturas elevadas ou baixas e disponibilidade baixa de nutrientes), em plantas, frutas e legumes em decomposição (NARAIAN & GAUTAM, 2018). *Penicillium* isolado de ambientes extremos pode ser usado para entender processos adaptativos que permitem a vida nesses tipos de ambientes. A evidência de sua existência em diversos habitats tem colaborado na exploração de aplicações biotecnológicas e industriais. O estudo desse tipo de isolado auxilia no entendimento da produção específica de metabólitos, enzimas ou compostos bioativos para aplicações em condições semelhantes (YADAV *et al*, 2018).

Fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* foram previamente detectados em estações de tratamento de águas residuais e, sob diferentes condições ambientais, os fungos desse gênero são capazes de produzir metabólitos secundários, como as micotoxinas (VIEGAS *et al*, 2014). Já os fungos pertencentes ao gênero *Tichoderma* geralmente estão ligados a tratamentos biológicos e os ambientes aos quais são submetidos também influenciam diretamente seu crescimento e a produção de enzimas (MOHAMED *et al*, 2006).

O *Sarocladium* foi estabelecido como um dos primeiros fungos patógenos que causam podridão na bainha do arroz e algumas espécies pertencentes a este gênero são comumente associadas a algumas espécies de plantas (LIU, 2017). *Sarocladium* também já foi isolado em diversos ambientes, incluindo máquinas de lavar louças (ZUPANCIC *et al*, 2016). Não se sabe ainda sobre a presença desse gênero de fungo em águas residuais industriais.

Fungos pertencentes ao gênero *Sarocladium* foram previamente classificados no grupo dos *Acremonium*, no entanto, em relação à investigação molecular recente, a taxonomia do *Acremonium* foi alterada e algumas importantes fitopatogênicas foram transferidas para o *Sarocladium* como um gênero separado (RAHIMI & MOHAMMADI, 2020).

Espécies de *Sarocladium*, como o *S. oryzae*, possuem aplicação para produção de compostos antimicrobianos (YEH & KIRSCHNER, 2014). Atualmente, são aceitas 21 espécies como *Sarocladium*, incluindo patógenos vegetais, patógenos humanos oportunistas, endófitos, micoparasitas e saprófitos (OU *et al*, 2020).

Mudanças nas condições ambientais dos efluentes industriais podem causar a extinção de certos grupos taxonômicos com funções ecológicas importantes nos consórcios

microbianos, bem como a disseminação de linhagens potencialmente patogênicas (PANDEY *et al*, 2014). Sabe-se também que a contaminação da água influencia os padrões de diversidade e composição das comunidades microbianas aquáticas, uma vez que essas comunidades são profundamente influenciadas pelas quantidades de nutrientes dissolvidos (LIU *et al*, 2017).

A maioria dos estudos de sequenciamento de microbiologia ambiental tem se concentrado em organismos procarióticos, e as comunidades eucarióticas microbianas têm sido geralmente negligenciadas (DEBROAS *et al*, 2017). Os fungos estão entre os grupos menos estudados de micro-organismos aquáticos, devido às dificuldades inerentes à sua cultura e sequenciamento de DNA (ORTIZ-VERA *et al*, 2018).

Um estudo sobre as comunidades bacterianas em efluentes da indústria têxtil constatou filos bacterianos mais comumente presentes entre eles, Planctomycetes, Chloroflexi, Chlorobi e Acidobacteria. Grande parte das bactérias são redutoras de sulfato e a variação de espécies nesse local é maior devida a tensões ambientais às quais as comunidades microbianas estão sujeitas. Alta salinidade, altas cargas orgânicas e uma temperatura mais alta da água são condições importantes que impulsionam a variação da comunidade microbiana em um efluente de indústria têxtil (MEERBERGEN *et al*, 2017).

Pesquisas sobre a estrutura da comunidade bacteriana de três estações de tratamento de águas de resíduos industriais detectaram os filos bacterianos Proteobacteria, Actinobacteria e Firmicutes como dominantes em todas as amostras coletadas, enquanto gêneros patogênicos como *Roseomonas* e *Enterobacter* também foram encontrados em grandes quantidades (OSUNMAKINDE *et al*, 2019).

O gênero *Bacillus* compreende 377 espécies de bactérias Gram-positivas em forma de bastonete. Sua capacidade de formar endósporos, sua diversidade de propriedades fisiológicas e sua capacidade de produzir inúmeros compostos antimicrobianos favorecem sua distribuição onipresente no solo, ambientes aquáticos, microbiota alimentar e intestinal de artrópodes e mamíferos (CAULIER *et al*, 2019).

A singularidade dos *Bacillus* reside na sua capacidade de produzir esporos que podem sobreviver a temperaturas e condições ambientais variadas. Além disso, as espécies de *Bacillus* apresentam um alto grau de plasticidade genética que permite a

colonização de uma ampla gama de habitats, incluindo sistemas como esgotos e águas residuais (PAES *et al*, 2012).

Ao que pode ser analisado até o momento, um número maior de *Penicillium* (n=13) foi isolado em relação a outros gêneros de fungos filamentosos. Da mesma forma, obteve-se uma boa quantidade de *Bacillus* (n=5) identificados. As propriedades inerentes a esses gêneros microbianos provavelmente estão envolvidas com uma melhor capacidade de adaptação a ambientes diferenciados em relação aos outros isolados encontrados em menor quantidade.

O ambiente de águas residuais da indústria têxtil costuma apresentar temperaturas mais altas que as normalmente encontradas em rios saudáveis. A temperatura da água no dia da coleta estava 28°C, o que pode ter interferido no isolamento de um maior número de micro-organismos, caso a temperatura estivesse maior. Além disso, a quantidade de poluentes químicos nocivos prejudica diretamente os organismos que vivem nesse ecossistema (ZHEZHOVA *et al*, 2014). Esses poluentes normalmente incluem sólidos suspensos e dissolvidos, demanda biológica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), produtos químicos, corantes de diversas tonalidades e toxicidades, metais como cobre, arsênio e zinco (HOLKAR *et al*, 2016).

A alteração dos componentes presentes no ambiente aquático através do despejo de poluentes de diferentes naturezas físicas e químicas contribuem para formação de um ambiente adverso que obriga a diversificação e adaptação microbiana (CONNOR *et al*, 2010). A relação molecular mais estreita entre as espécies encontradas sugere que esses micro-organismos podem ter sofrido alterações genéticas favoráveis à sua proliferação, conferindo vantagens e sobrevivência no meio diferenciado (LIU *et al*, 2017).

Essas características podem ter contribuído diretamente para alteração dos grupos microbianos presentes, podendo haver tanto uma diminuição quanto um aumento das comunidades microbianas e de suas atividades metabólicas. Apenas um estudo mais detalhado de isolamento, caracterização e identificação por sequenciamento molecular de todos os micro-organismos poderia elucidar a riqueza de espécies presentes capazes de sobreviver a esse ambiente adverso.

4.4.2 Caracterização Molecular

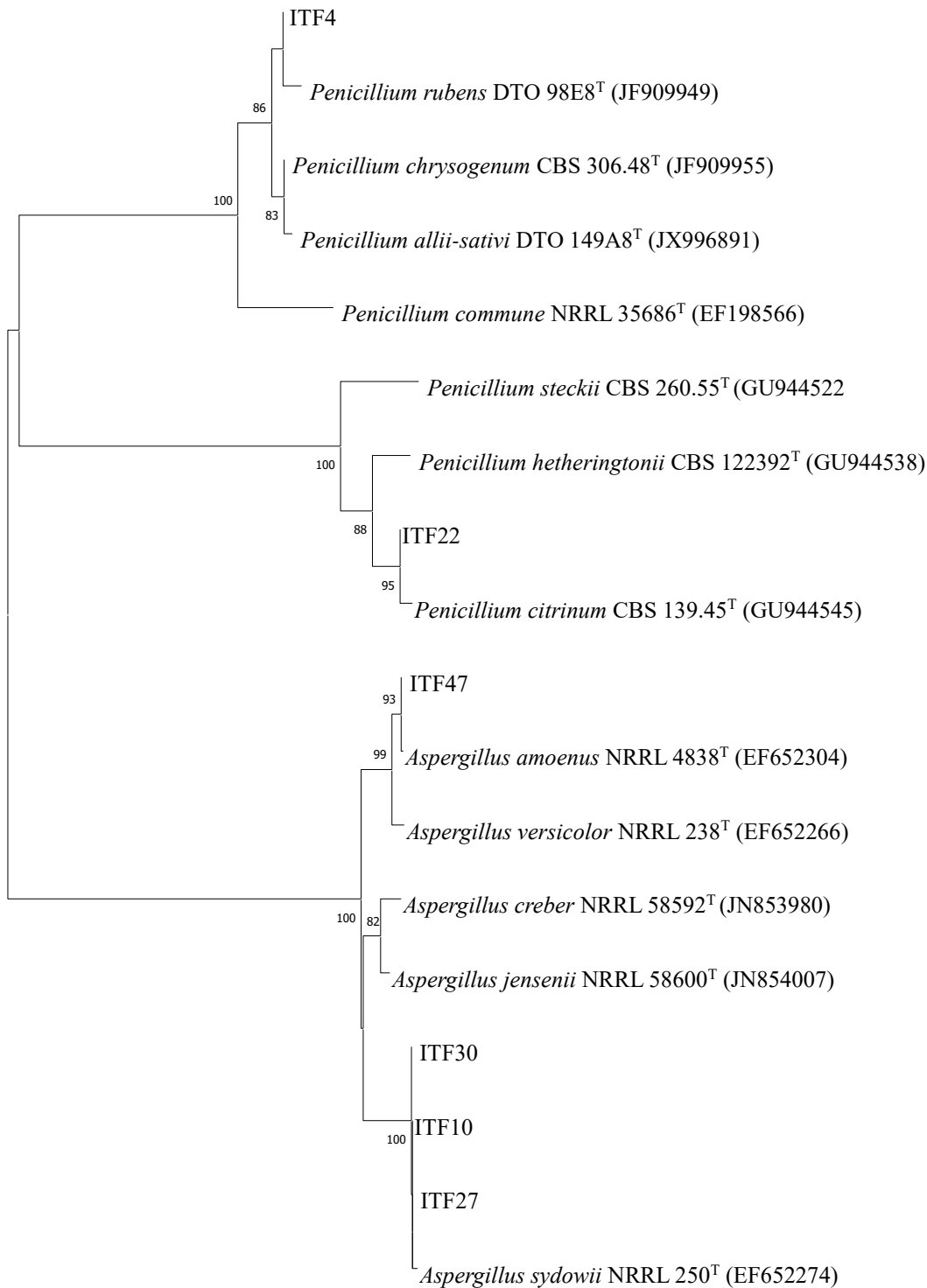
Através de métodos de sequenciamento de genes ribossomais e funcional, foram identificados 9 principais micro-organismos (8 fungos filamentosos e 1 bactéria) de interesse biotecnológico de acordo com suas atividades nos testes realizados neste estudo, sendo esses isolados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Identificação molecular dos isolados microbianos de interesse biotecnológico

| Isolado | Espécies | Nº de acesso Gen Bank | Similaridade | Coleção de cultura |
|------------------------------------|------------------------------|-----------------------|--------------|-------------------------|
| β-tubulina | | | | |
| ITF4 | <i>Penicillium rubens</i> | JF909949.1 | 100.00% | DTO 98E8 ^T |
| ITF10 | <i>Aspergillus sydowii</i> | EF652274.1 | 100.00% | NRRL 250 ^T |
| ITF22 | <i>Penicillium citrinum</i> | GU944545.1 | 100.00% | CBS 139.45 ^T |
| ITF27 | <i>Aspergillus sydowii</i> | EF652274.1 | 100.00% | NRRL 250 ^T |
| ITF30 | <i>Aspergillus sydowii</i> | EF652274.1 | 100.00% | NRRL 250 ^T |
| ITF47 | <i>Aspergillus amoenus</i> | EF652304.1 | 100.00% | NRRL 4838 ^T |
| ITS | | | | |
| ITF33 | <i>Sarocladium</i> sp. | - | 89.06% | - |
| ITF29 | <i>Trichoderma harzianum</i> | AJ222720.1 | 100.00% | CBS 226.95 ^T |
| 16s RNA | | | | |
| ITB47 | <i>Bacillus</i> sp. | - | 99.80% | - |

Para elaboração da árvore filogenética dos isolados ITF4; 10; 22; 27; 30 e 47, foi utilizado o gene da expressão da β -tubulina (Figura 22) e para os fungos ITF29 e 33 foi utilizado o gene ribossomal ITS (Figura 23). A bactéria foi identificada utilizando o gene ribossomal 16S (Figura 24). As árvores filogenéticas foram elaboradas utilizando o programa MEGA X.

Figura 22 – Arvore filogenética dos isolados ITF4; 10; 22; 27; 30 e 47.

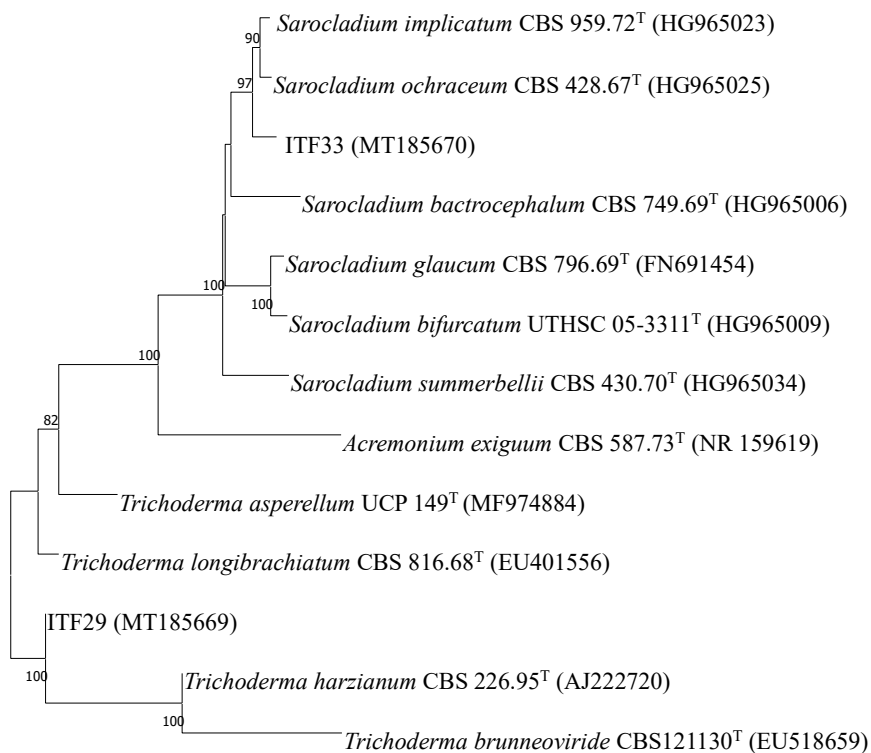


0.050

Análise filogenética baseada em sequências do gene β -tubulina dos isolados recuperados da amostra têxtil e espécies relacionadas. Valores de Bootstrap (1000 execuções replicadas, mostradas em%) acima de 70% são listados.

Todos os 6 fungos filamentosos com 100% de similaridade com as espécies comparadas nos bancos de dados. Foram identificados 2 *Penicillium* (ITF4 *Penicillium rubens* e ITF22 *Penicillium citrinum*) e 4 *Aspergillus* (ITF10, 27 e 30 *Aspergillus sydowii* e ITF47 *Aspergillus amoenus*). Observando o *cluster* formado com os isolados afiliados a espécie *Aspergillus sydoii* (ITF10, 27 e 30) (Figura 22), podemos dizer o isolado ITF30, ficou fora do *cluster* formado entre os isolados ITF 10 e 27, o que pode sugerir que esse fungo apresente características evolutivas distintas dos demais isolados identificados com *A. sydowii*, necessitando assim de estudos complementares como sequenciamento de outros genes, estudos morfológicos e bioquímicos.

Figura 23 – Arvore filogenética dos isolados ITF29 e 33



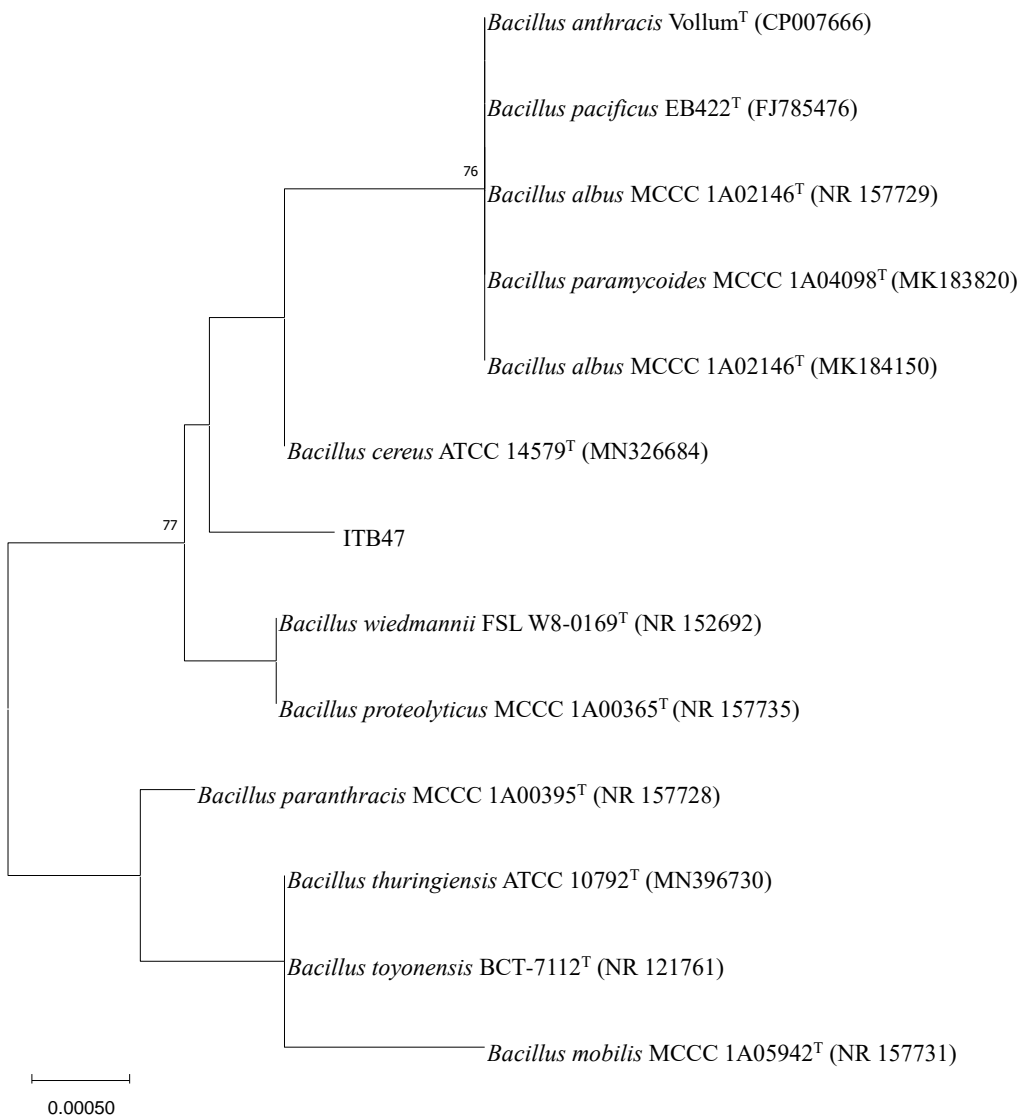
0.050

Análise filogenética baseada em seqüências do gene rDNA ITS dos isolados recuperados da amostra têxtil e espécies relacionadas. Valores de Bootstrap (1000 execuções replicadas, mostradas em%) acima de 70% são listados. Número de acesso ao GenBank são listados após os nomes das espécies.

O sequenciamento do gene ribossomal ITS realizado com os 2 fungos que apresentaram características diferentes no microcultivo revelaram 1 *Trichoderma* (ITF29 *Trichoderma harzianum*) e 1 *Sarocladium* (ITF33) (Figura 23) cuja identificação não foi

possível chegar a espécie exata através dos bancos de dados. A espécie mais próxima é o *Sarocladium implicatum* com similaridade 89.06%, sugerindo que pode se tratar de uma espécie ainda não relatada. Novos testes de sequenciamento precisariam ser realizados para sequenciar o gene D1/D2 (gene RNAr 28S) e comparar com os bancos de dados disponíveis.

Figura 24 – Arvore filogenética da bactéria ITB47



Análise filogenética baseada em sequências do gene rDNA 16S dos isolados recuperados da amostra têxtil e espécies relacionadas. Valores de Bootstrap (1000 execuções replicadas, mostradas em%) acima de 70% são listados.

O gene 16S RNA foi capaz de identificar a bactéria ITB47 como pertencente ao grupo do *Bacillus cereus* (Figura 24) com similaridade de 99.80%. Essa

abordagem não pôde atribuir com precisão à espécie, de acordo com sua baixa discriminação. Apenas com novas metodologias de sequenciamento como a de tipagem de sequência de múltiplos locus (MLST) possibilitaria uma caracterização mais seletiva da espécie encontrada (LIU *et al*, 2017).

4.5 Potencial biotecnológico de fungos e bactérias isolados de indústria têxtil

Através dos dados apresentados na Tabela 6, pode-se notar que todos os fungos (n=28) isolados e reativados provenientes de efluente de indústria têxtil foram capazes de produzir algum composto com potencial biotecnológico. No caso das bactérias isoladas, 20 foram capazes de produzir compostos de interesse e 15 não apresentaram nenhuma atividade nos testes realizados neste estudo.

| | | | | | | | | | |
|--------------|-------|-------|------|------|-----|-----|-----|---|----------------------------|
| ITF43 | | | | | | | | | <i>Aspergillus sp</i> |
| ITF47 | 50,69 | | | 0,25 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 1 | <i>Aspergillus amoenus</i> |
| ITB14 | | | | | | | | | NI |
| ITB15 | | | | | | | | | NI |
| ITB16 | | | | | | | | | NI |
| ITB17 | | | | | | | | | NI |
| ITB18 | 14,43 | | | | | | | | NI |
| ITB21 | | | | | | | | | NI |
| ITB22 | 30,39 | | | | | | | | NI |
| ITB24 | 0,015 | 49,42 | | | | | | | <i>Bacillus sp</i> |
| ITB25 | | | | | | | | | NI |
| ITB26 | | | | | | | | | NI |
| ITB27 | | | | | | | | | NI |
| ITB29 | | | | | | | | | NI |
| ITB31 | | | | | | | | | NI |
| ITB35 | | 7,91 | 0,29 | | | | | | <i>Bacillus sp</i> |
| ITB37 | | 7,25 | | | | | | | NI |
| ITB38 | | | | | | | | | NI |
| ITB40 | | 8,24 | | | | | | | <i>Bacillus sp</i> |
| ITB43 | | | | | | 1 | | | <i>Bacillus sp</i> |
| ITB45 | | | | | | | | | NI |
| ITB47 | | 9,47 | | 1 | 0,5 | 1 | | 1 | <i>Bacillus sp.</i> |

Os isolados de maior interesse biotecnológico encontrados foram os fungos filamentosos ITF13 (não identificado), ITF30 (*Aspergillus sydowii*), ITF 33 (*Sarocladium* sp.) e ITF47 (*Aspergillus amoenus*), e as bactérias ITB24 (*Bacillus* sp.) e ITB47 (*Bacillus cereus*).

O isolado que obteve um maior número de resultados promissores foi o ITF33 (*Sarocladium* sp.). Esse fungo apresentou atividade de celulase em placas com CMC, produção de proteases intra e extracelulares, atividade gelatinolítica e colagenolítica, além da produção de metabólitos antimicrobianos contra 4 bactérias patogênicas testadas, Gram-positivas e Gram-negativas, demonstrando atividade de amplo espectro.

O isolado *Sarocladium* sp., não apresentou o melhor resultado no teste de atividade enzimática específica de proteases em comparação com os demais fungos testados, mas os resultados obtidos com o teste de gelatinase demonstraram alta atividade, fazendo com que esse isolado fosse o único selecionado para realização do teste de atividade colagenolítica. Os resultados mostraram uma alta capacidade de aplicação do *Sarocladium* sp., principalmente na área de saúde. A produção de metabólitos e enzimas pode ainda ser melhorada e mais explorada através de pesquisas com fungos desse gênero, melhorando sua atividade através de técnicas de detecção de melhores meios de cultivo, pH e temperatura.

Outro isolado de interesse e que pode ser utilizado para aplicações foi o fungo ITF13. Este isolado não foi identificado, entretanto, obteve atividades enzimáticas significativas em placas para lacase, celulase e protease, também apresentando a melhor atividade enzimática específica extracelular para proteases entre os fungos estudados. O ITF13 também foi capaz de inibir o crescimento de todas as 5 bactérias patogênicas testadas, demonstrando uma alta aplicabilidade no segmento farmacêutico devido a sua atividade de amplo espectro.

Aspergillus sydowii ITF30 apresentou atividades enzimáticas para lacase e celulase, além de sua atividade antimicrobiana contra a *E.coli*, o qual obteve o menor valor (0,031 mg mL⁻¹) de concentração de MIC deste estudo. Outro fungo do gênero *Aspergillus* que obteve bons resultados foi o isolado ITF47 *Aspergillus amoenus*. A atividade antimicrobiana em MIC revelou que esse isolado inibiu o crescimento de todas as bactérias patogênicas testadas, sendo capaz de inibir 4 das bactérias testadas em concentrações inferiores a 1 mg mL⁻¹. Através dos dados coletados na literatura e colocados em discussão neste estudo, sabe-se que os fungos desta espécie ainda são pouco explorados e os resultados obtidos revelam esse isolado como um produtor promissor de antimicrobianos. Além da

atividade antimicrobiana, o isolado ITF47 *Aspergillus amoenus* apresentou atividade de lacase em placa com guaiacol e obteve o melhor resultado de produção de celulase deste estudo ($50,69 \text{ U mL}^{-1}$), tornando-se também um potencial candidato produtor dessa enzima para aplicações industriais de produção de bioetanol de segunda geração.

Todos os fungos (n=28) testados apresentaram atividade enzimática em pelo menos um dos testes realizados, sendo que todos foram capazes de produzir atividade de celulase em placas contendo CMC. Todas as bactérias produtoras de compostos (n=20) de interesse deste estudo foram capazes de produzir pelo menos uma atividade enzimática, isso demonstra o alto potencial de produção enzimática de todos os isolados microbianos obtidos neste estudo e que podem ser aplicados em diversos segmentos industriais, principalmente na saúde e indústria de enzimas.

5 CONCLUSÃO

Os objetivos do presente trabalho foram alcançados tendo em vista a identificação de fungos filamentosos e bactérias com um grande potencial biotecnológico, podendo ser aplicados em processos de biorremediação, diversos setores industriais, principalmente o ramo farmacêutico. Poucos estudos foram encontrados relatando a atividade de micro-organismos provenientes do efluente de uma indústria têxtil. Esse ambiente apresentou diversidade de espécies isoladas e se mostrou atraente para pesquisas de compostos de interesse biotecnológico. Com mais estudos acerca da comunidade microbiana desses ambientes, mais informações poderiam ser recuperadas para o melhor entendimento dos grupos microbianos presentes neste ambiente de despejo industrial.

A busca por compostos biotecnológicos produzidos por micro-organismos provenientes de ambientes hostis, como o efluente industrial têxtil, se mostrou bastante promissor na obtenção de enzimas para fins industriais, como é o caso da celulase, e com alta aplicabilidade médica, como é o caso das lacases, proteases e, principalmente as gelatinases e as collagenases. A exposição a condições adversas também pode ter favorecido a produção de compostos antimicrobianos por algumas espécies que até então, foram relatadas pela primeira vez como produtoras de antibióticos, como é o caso da espécie *Aspergillus amoenus*. Como o efluente industrial têxtil ainda pode ser largamente explorado, nossos estudos mostraram a possibilidade da obtenção de isolados microbianos distintos dos micro-organismos até então caracterizados, como o caso dos isolados ITF33 (*Sarocladium* sp.) o melhor isolado com potencial biotecnológico e o ITF30 (*Aspergillus sydooi*), os quais, ainda precisam ser mais estudados para confirmar esse achado.

A adaptação de uma comunidade microbiana ao estresse ambiental pode envolver indução de enzimas, alterações genéticas e a produção de metabólitos secundários. Há evidências consideráveis de que os micro-organismos podem se adaptar rapidamente a substâncias tóxicas em seu ambiente. Porém, a consequência inevitável deve ser a diminuição da diversidade genética, limitando a sobrevivência aos micro-organismos com melhores recursos de adaptação.

Existe uma necessidade crescente da exploração de novos ambientes para identificação de bactérias e fungos que possam trazer benefícios a sociedade, tanto na

produção de enzimas com finalidades industriais, quanto na produção de componentes que possam ser aplicados para saúde. Assim, a exploração de ambientes considerados tóxicos como os estudados no presente trabalho torna-se uma estratégia na obtenção de células adaptadas a esses compostos, as quais poderão ser utilizadas em processos industriais e de tratamento do próprio efluente estudado. Estudos futuros de otimização, escalonamento e purificação dos compostos biotecnologicamente promissores, produzidos pelas células microbianas no presente estudo, poderão ser realizados com o intuito de aplicar estes compostos para melhorar a qualidade de vida da sociedade, principalmente os relacionados a saúde humana.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAMIR, S.; SUTAR, S.; SINGH, S, K.; BAGHELA, A. A rapid and eficiente method of fungal genomic DNA extraction, suitable for PCR based molecular methods. **Plant Pathology & quarantine**. 5 (2): 74-81, 2015.

ABDALLAH, Y. K.; ESTEVEZ, A. T.; TANTAWY, D. E. D. M.; IBRAHEEM, A. M.; KHALIL, N. M. Employing Laccase-Producing *Aspergillus sydowii* NYKA 510 as a Cathodic Biocatalyst in Self-Sufficient Lighting Microbial Fuel Cell. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 29, n. 12, p. 1861–1872, 2019.

ABDEL MONSSEF, R. A.; HASSAN, E. A.; RAMADAN, E. M. Production of laccase enzyme for their potential application to decolorize fungal pigments on aging paper and parchment. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 61, n. 1, p. 145–154, 2016.

ABDEL-FATAH, O. M.; HASSAN, M. M.; ELSHAFEI, A. M.; HAROUN, B. M.; ATTA, H. M.; OTHMAN, A. M. Physiological studies on carboxymethyl cellulase formation by *Aspergillus terreus* DSM 826. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 1–11, 2012.

ABDEL-FATTAH, A. Production and partial characterization of collagenase from marine *Nocardiopsis dassonvillei* NRC2aza using chitin wastes. **Egyptian Pharmaceutical Journal**, v. 12, n. 2, p. 109, 2013.

ABE, C. A. L.; FARIA, C. B.; DE CASTRO, F. F.; DE SOUZA, S. R.; DOS SANTOS, F. C.; DA SILVA, C. N.; TESSMANN, D. J.; BARBOSA-TESSMANN, I. P. Fungi isolated from maize (*Zea mays* L.) grains and production of associated enzyme activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 15328–15346, 2015.

ABFALTER, C. M.; SCHÖNAUER, E.; PONNURAJ, K.; HUEMER, M.; GADERMAIER, G.; REGL, C.; BRIZA, P.; FERREIRA, F.; HUBER, C. G.; BRANDSTETTER, H.; POSSELT, G.; WESSLER, S. Cloning, Purification and Characterization of the Collagenase ColA Expressed by *Bacillus cereus* ATCC 14579. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–19, 2016.

ABRAR, T.; HAMZA, T. A. Bacterial Protease Enzyme: Safe and Good Alternative for Industrial and Commercial Use Sugar Cane Production Via Tissue Culture Methods View project Bacterial Protease Enzyme: Safe and Good Alternative for Industrial and Commercial Use. **International Journal of Chemical and Biomolecular Science**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2017.

ACHARYA, S.; CHAUDHARY, A. Bioprospecting thermophiles for cellulase production: A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 844–856, 2012.

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117–139, 2014.

AFOLABI, A. S.; SCIENCE, S. Biotechnology : New Opportunities for Provision of Renewable and Alternative Energy for Sustainable Growth. **Proc. Intl. Conf. Ecosys. Con. Sus. Dev.**, 17-31 n. February, 2014.

AHMAD, M.; PATACZEK, L.; HILGER, T. H.; ZAHIR, Z. A.; HUSSAIN, A.; RASCHE, F.; SCHAFLEITNER, R.; SOLBERG, S. Perspectives of microbial inoculation for sustainable development and environmental management. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. DEC, 2018.

AHMAD, T.; ISMAIL, A.; AHMAD, S. A.; KHALIL, K. A.; TEIK KEE, L.; AWAD, E. A.; SAZILI, A. Q. Physicochemical characteristics and molecular structures of gelatin extracted from bovine skin: effects of actinidin and papain enzymes pretreatment. **International Journal of Food Properties**, v. 22, n. 1, p. 138–153, 2019.

ALI, N.; ULLAH, N.; QASIM, M.; RAHMAN, H.; KHAN, S. N.; SADIQ, A.; ADNAN, M. Molecular characterization and growth optimization of halo-tolerant protease producing *Bacillus Subtilis* Strain BLK-1.5 isolated from salt mines of Karak, Pakistan. **Extremophiles**, v. 20, n. 4, p. 395–402, 2016.

ALIPOUR, H.; RAZ, A.; ZAKERI, S.; DINPARAST, D. N. Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 6(11), 975–981, 2016.

ALMALKI, M.; DHAS, D.; VARGHESE, R.; VIJAYARAGHAVAN, P. Production and Characterization of Halo Tolerant Alkaline Protease of *Enterobacter aerogenes* Strain ZB and Its Application. **Biotechnology Journal International**, v. 20, n. 1, p. 1–8, 2017.

AMORE, A.; PEPE, O.; VENTORINO, V.; BIROLO, L.; GIANGRANDE, C.; FARACO, V. Cloning and recombinant expression of a cellulase from the cellulolytic strain *Streptomyces* sp. G12 isolated from compost. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 1–12, 2012.

ANBU, P.; GOPINATH, S. C. B.; CHAULAGAIN, B. P.; LAKSHMIPRIYA, T. Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine 2016. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

ANITHA, T. S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. **Protein Expression and Purification**, v. 88, n. 2, p. 214–220, 2013.

ANTUNES, T. C.; BALLARINI, A. E.; SAND, S. VAN DER. Temporal variation of bacterial population and response to physical and chemical parameters along a petrochemical industry wastewater treatment plant. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 91, n. 2, p. e20180394, 2019.

ANTUNES, T.C., YAMASHITA, K.M., BARBARO, K.C., SAIKI, M., SANTORO, M.L. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon** 56, 1443-1458, 2010.

ANWAR, J.; IQBAL, Z. Effect of Growth Conditions on Antibacterial Activity of *Trichoderma harzianum* against Selected Pathogenic Bacteria. **Sarhad Journal of Agriculture** v 33 p 501, 2017.

Applications. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 6, p. 568–579, 2014.

ARREGUI, L.; AYALA, M.; GÓMEZ-GIL, X.; GUTIÉRREZ-SOTO, G.; HERNÁNDEZ-LUNA, C. E.; HERRERA DE LOS SANTOS, M.; LEVIN, L.; ROJO-DOMÍNGUEZ, A.; ROMERO-MARTÍNEZ, D.; SAPARRAT, M. C. N.; TRUJILLO-ROLDÁN, M. A.; VALDEZ-CRUZ, N. A. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 1–33, 2019.

ASSRESS, H. A.; SELVARAJAN, R.; NYONI, H.; NTUSHELO, K.; MAMBA, B. B.; MSAGATI, T. A. M. Diversity, Co-occurrence and Implications of Fungal Communities in Wastewater Treatment Plants. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2019.

BALAN, S. S.; NETHAJI, R.; SANKAR, S.; JAYALAKSHMI, S. Production of gelatinase enzyme from *Bacillus* spp isolated from the sediment sample of Porto Novo Coastal sites. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3 SUPPL., 2012.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.

BANERJEE, G.; MUKHERJEE, S.; BHATTACHARYA, S.; RAY, A. K. Purification and Characterization of Extracellular Protease and Amylase Produced by the Bacterial Strain, *Corynebacterium alkanolyticum* ATH3 Isolated from Fish Gut. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 41, n. 1, p. 9–16, 2016.

BATISTA, E.; WATANABE, J. Y. M.; OLIVEIRA, V. M.; PASSARINI, M. R. Z. Avaliação da Produção de Amilase e Protease por Bactérias da Antártica. **Rev. Bras. de Iniciação Científica (RBIC)**, Itapetininga, v. 5, n.2, p. 13-29, 2018.

BEATTIE, A. J.; HAY, M.; MAGNUSSON, B.; DE NYS, R.; SMEATHERS, J.; VINCENT, J. F. V. Ecology and bioprospecting. **Austral Ecology**, v. 36, n. 3, p. 341–356, 2011.

BILLS, G. F.; GLOER, J. B.; AN, Z. Coprophilous fungi: Antibiotic discovery and functions in an underexplored arena of microbial defensive mutualism. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 549–565, 2013.

BLACKWELL, M.; VEGA, F. E. Lives within lives: Hidden fungal biodiversity and the importance of conservation. **Fungal Ecology**, v. 35, p. 127–134, 2018.

BLIEVA, R.; ZHAKIPBEKOVA, A.; AKHMETSADYKOV, N.; KALIEVA, A.; SADUYEVA, Z. H. Optimization of physiochemical requirements on collagenase production from *Aspergillus* fungi. **European Journal of Biotechnology and Bioscience**. p. 27–29, 2018.

BLIEVA, R.; ZHAKIPBEKOVA, A.; AKHMETSADYKOV, N.; KALIEVA, A.; SADUYEVA, Z. H. Optimization of physiochemical requirements on collagenase production from *Aspergillus* fungi. **European Journal of Biotechnology and Bioscience**. p. 27–29, 2018.

BLUM, H., HILDBURG, B., GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins. RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**. 8, p 93-99. 1987.

BORGES, C. L.; PARENTE, J. A.; BARBOSA, M. S.; SANTANA, J. M.; BÁO, S. N.; DE SOUSA, M. V.; DE ALMEIDA SOARES, C. M. Detection of a homotetrameric structure and protein-protein interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* formamidase lead to new functional insights. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 1, p. 104–113, 2010.

BRACARENSE, A. A. P.; TAKAHASHI, J. A. Modulation of antimicrobial metabolites production by the fungus *Aspergillus parasiticus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 313–321, 2014.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y.; CHANG, S. Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and lacase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, n. 1, p. 81–87, 1995.

CALIN, M.; RAUT, I.; DONI, M.; ALEXANDRESCU, E.; MACOVESCU, G.; ARSENE, M. L.; GURBAN, A. M.; VASILESCU, G.; JECU, L. The potential of keratinolytic fungi for biotechnological applications in leather manufacture. **Revista de Chimie**, v. 70, n. 9, p. 3152–3157, 2019.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Antioxidant activities and functional properties of soy protein isolate hydrolysates obtained using microbial proteases. **International Journal of Food Science and Technology**, 49, 317–328, 2014.

CAULIER, S.; NANNAN, C.; GILLIS, A.; LICCIARDI, F.; BRAGARD, C.; MAHILLON, J. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. FEB, p. 1–19, 2019.

CAVELLO, I. A.; HOURS, R. A.; ROJAS, N. L.; CAVALITTO, S. F. Purification and characterization of a keratinolytic serine protease from *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 5–6, p. 972–978, 2013.

CHAHINIAN, N.; BANCON-MONTIGNY, C.; CARO, A.; GOT, P.; PERRIN, J. L.; ROSAIN, D.; RODIER, C.; PICOT, B.; TOURNOUD, M. G. The role of river sediments in contamination storage downstream of a wastewater treatment plant in low flow conditions: Organotins, faecal indicator bacteria and nutrients. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 114, p. 70–81, 2012.

CHANDRA, S. J.; SHANKER, A. S.; PINDI, P. K. Isolation and characterization of novel and efficient protease producing bacteria from drinking water resources. **Water Supply**, 2019.

CHANDRASEKARAN, M.; THANGAVELU, B.; CHUN, S. C.; SATHIYABAMA, M. Proteases from phytopathogenic fungi and their importance in phytopathogenicity. **Journal of General Plant Pathology**, v. 82, n. 5, p. 233–239, 2016.

CHAUHAN, P. S., GORADIA, B., SAXENA, A. Bacterial laccase: recent update on production, properties and industrial applications. **3 Biotech**, 7(5), 1–20, 2017.

CHEONG, S. H.; CHOI, Y. W.; MIN, B. S.; CHOI, H. Y. Polymerized urushiol of the commercially available rhus product in Korea. **Annals of Dermatology**, v. 22, n. 1, p. 16–20, 2010.

Collagenase clostridium histolyticum. **DRUGBANK**. 2020. Disponível em <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00048>>.

CONG, B.; WANG, N.; LIU, S.; LIU, F.; YIN, X.; SHEN, J. 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.

CONNOR, N.; SIKORSKI, J.; ROONEY, A. P.; KOPAC, S.; KOEPEL, A. F.; BURGER, A.; COLE, S. G.; PERRY, E. B.; KRIZANC, D.; FIELD, N. C.; SLATONT, M.; COHAN, F. M. Ecology of speciation in the genus *Bacillus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1349–1358, 2010.

COUTO, S. R.; HERRERA, J. L. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnology Advances**, Volume 24, Issue 5, p. 500-513, September–October 2006.

CRAIK, C. S.; PAGE, M. J.; MADISON, E. L. Proteases as therapeutics. **HHS Public Access**. v. 435, n. 1, p. 1–16, 2011.

CYCON, M.; MROZIK, A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Antibiotics in the soil environment—degradation and their impact on microbial activity and diversity. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAR, 2019.

DEBROAS, D.; DOMAIZON, I.; HUMBERT, J. F.; JARDILLIER, L.; LEPÉRE, C.; OUDART, A.; TAIB, N. Overview of freshwater microbial eukaryotes diversity: A first analysis of publicly available metabarcoding data. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 4, p. 1–14, 2017.

DEERLAND.; Deerland Enzymes, **Inc. All Rights Reserved**. Acesso em: Setembro de 2019. deerland.com/glutalytic/gluten-digestion, 2015.

DEMAIN, A. L. Microbial biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 26–31, 2000.

DERYUGINA, E. I.; QUIGLEY, J. P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, n. 1, p. 9–34, 2006.

DEVEAU, A.; BONITO, G.; UEHLING, J.; PAOLETTI, M.; BECKER, M.; BINDSCHEDLER, S.; HACQUARD, S.; HERVÉ, V.; LABBÉ, J.; LASTOVETSKY, O. A.; MIESZKIN, S.; MILLET, L. J.; VAJNA, B.; JUNIER, P.; BONFANTE, P.; KROM, B. P.; OLSSON, S.; VAN ELSAS, J. D.; WICK, L. Y. Bacterial-fungal interactions: Ecology, mechanisms and challenges. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, n. 3, p. 335–352, 2018.

DIMASIA, J. A.; GRABOWSKIB, H. G.; The Cost of Biopharmaceutical R&D: Is Biotech Different. **InterScience. Manage. Decis. Econ.** 28: 469–479, 2007.

DING, W.; LIU, W. Q.; JIA, Y.; LI, Y.; VAN DER DONK, W. A.; ZHANG, Q. Biosynthetic investigation of phomopsins reveals a widespread pathway for ribosomal natural products in Ascomycetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 13, p. 3521–3526, 2016.

DOUGAN, D. A.; BRONDSTED, L.; INGMER, H. Regulated Proteolysis in Microorganisms. Department of Veterinary Disease Biology, Faculty of Life. **Sciences, Springer Science**, 2013.

DUARTE, A. S.; CORREIA, A.; ESTEVES, A. C. Bacterial collagenases - A review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 106–126, 2016.

DUARTE, A. S.; CORREIA, A.; ESTEVES, A. C. Bacterial collagenases - A review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 106–126, 2016.

EKPENYONG, M.; ASITOK, A.; ANTAI, S. P. Production and Activity Kinetics Of Gelatinase By *Serratia* sp . **Nigerian Journal of Biopesticides**. v 1 (1): pp.70-82 June, 2016.

ENGUIITA, F. J. Structural biology of fungal multicopper oxidases. **Mycofactories**, n. January 2011, p. 57–72, 2011.

FRISK, M. L. Multifaceted microbes. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 51–52, 2011.

FULZELE, R.; DESA, E.; YADAV, A.; SHOUCHE, Y.; BHADEKAR, R. Characterization of novel extracellular protease produced by marine bacterial isolate from the Indian Ocean. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1364–1373, 2011.

FUNG, K. Y.; WIBOWO, C. Design of industrial wastewater treatment plants: A multifaceted problem. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 2, n. 4, p. 455–460, 2013.

FURHAN, J.; SHARMA, S. Microbial alkaline proteases : Findings and applications. **International Journal of invention in Pharmaceutical sciences**, v. 2, n. 4, p. 823–834, 2014.

GALASSO, O.; FAMILIARI, F.; DE GORI, M.; GASPARINI, G. Recent Findings on the Role of Gelatinases (Matrix Metalloproteinase-2 and -9) in Osteoarthritis. **Advances in Orthopedics**, v. 2012, p. 1–7, 2012.

GAO, J.; QIAN, Y.; WANG, Y.; QU, Y.; ZHONG, Y. Production of the versatile cellulase for cellulose bioconversion and cellulase inducer synthesis by genetic improvement of *Trichoderma reesei* Michael Wang. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2017.

GAUTAM, M.; AZMI, W. Screening and isolation of collagenase producing microorganism from proteins waste found in Himalayan region. **Journal of Applied Biotechnology Reports**, v. 4, n. 1, p. 558–565, 2017.

GEORGIU, D.; AIVASIDIS, A. Cotton-Textile Wastewater Management: Investigating Different Treatment Methods. **Water Environment Research**, v. 84, n. 1, p. 54–64, 2012.

GOMEZ-GUILLEN, M. C.; GIMENEZ, B.; LOPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1813–1827, 2011.

GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; LAKSHMIPRIYA, T.; HILDA, A. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 31–34, 2013.

GUNDE-CIMERMAN, N.; RAMOS, J.; PLEMENITAŠ, A. Halotolerant and halophilic fungi. **Mycological Research**, v. 113, n. 11, p. 1231–1241, 2009.

GUNESER, M. B.; ELDENIZ, A. U. The effect of gelatinase production of *Enterococcus faecalis* on adhesion to dentin after irrigation with various endodontic irrigants. **Acta Biomaterialia Odontologica Scandinavica**, v. 2, n. 1, p. 144–149, 2016.

GURUNG, N.; RAY, S.; BOSE, S.; RAI, V. A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

HASEENA, M.; MALIK, M. F.; JAVED, A.; ARSHAD, S.; ASIF, N.; SHARON ZULFIQAR; HANIF, J. Water pollution and human health. **Environmental Risk Assessment and Remediation**, v. 1, n. 3, p. 16–19, 2017.

HAZRA, D. & UPADHYAY, A. K. Computational Tools and Databases of Microbes and Its Bioprospecting for Sustainable Development. **Microbial Bioprospecting for Sustainable Development**. p. 385–397, 2018.

HITTALMANI, S.; MAHESH, H. B.; MAHADEVAIAH, C.; PRASANNAKUMAR, M. K. De novo genome assembly and annotation of rice sheath rot fungus *Sarocladium oryzae* reveals genes involved in Helvolic acid and Cerulenin biosynthesis pathways. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2016.

HOLKAR, C. R.; JADHAV, A. J.; PINJARI, D. V.; MAHAMUNI, N. M.; PANDIT, A. B. A critical review on textile wastewater treatments: Possible approaches. **Journal of Environmental Management**, v. 182, p. 351–366, 2016.

HOLKER, U.; DOHSE, J.; OFER, M, H. Extracellular laccases “ in ascomycetes *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*. **Folia Microbiologica**, vol. 47, no. 4, pp. 423–427, 2002.

HONIG, S. C. Intralesional collagenase in the treatment of Peyronie's disease. **Therapeutic Advances in Urology**, v. 6, n. 2, p. 47–53, 2014.

HOYOS, R. C. M.; MORALES-ÁLVAREZ, E. D.; POUTOU-PIÑALES, R. A.; PEDROZA-RODRÍGUEZ, A. M.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; DELGADO-BOADA, J. M. Fungal laccases. **Fungal Biology Reviews**, v. 27, n. 3–4, p. 67–82, 2013.

HSIEH, Y. L. Chemical structure and properties of cotton. **Cotton: Science and technology**. University of California – USA, 2007.

IMURA, T. M.; AZAKI, K. Y.; AWAKI, K. S.; ZAWA, T. O.; AWAGUCHI, M. K. Hydroxy Radical Scavenging Effect of Guaiacol Used in Tradicional Dental Pulp Dental. **Biomedical Research** v. 26, n. 4, p. 139–145, 2005.

ISLAM, F.; ROY, N. Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses. **BMC Research Notes**, v. 11, n. 1, p. 1–6, 2018.

JIMENEZ-JUAREZ, N.; ROMAN-MIRANDA, R.; BAEZA, A.; SÁNCHEZ-AMAT, A.; VAZQUEZ-DUHALT, R.; VALDERRAMA, B. Alkali and halide-resistant catalysis by the multipotent oxidase from *Marinomonas mediterranea*. **Journal of biotechnology**, v. 117, n. 1, p. 73–82, 2005.

JISHA, V.; B. SMITHA, R.; PRADEEP, S.; SREEDEVI, S.; N. UNNI, K.; SAJITH, S.; PRIJI, P.; SARATH JOSH, M.; BENJAMIN, S. Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, v. 01, n. 03, p. 39–51, 2013.

JONES, B. V.; SUN, F.; MARCHESI, J. R. Using skimmed milk agar to functionally screen a gut metagenomic library for proteases may lead to false positives. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 418–420, 2007.

JOSEPH, J.; SASIDHARAN, H.; O.S, C. Isolation, Production and Characterisation of Novel Gelatinase Enzyme From Bacillus Spp. **International Journal of Scientific Research in Biological Sciences**, v. 5, n. 6, p. 111–120, 2019.

JUCÁ, M.; NUNES, B. L. B. B. P.; DE MENEZES, H. L.; GOMES, E. G. de A.; MATOS, D. Metalloproteinases 1 and 7 and colorectal cancer. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 28, n. 3, p. 353–362, 2008.

JUNIER, P.; JOSEPH, E. Microbial biotechnology approaches to mitigating the deterioration of construction and heritage materials. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 1145–1148, 2017.

JÚNIOR, H. J. T.; FIRMINO, A. C.; FISCHER, I. H.; FURTADO, E. L.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. Associados às frutíferas no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 4, p. 270–280, 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.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 188–203, 2014.

KALWASIŃSKA, A.; JANKIEWICZ, U. Alkaline and Halophilic Protease Production by *Bacillus luteus* H11 and Its Potential Industrial Applications. **Food Technology & Biotechnology** v. 6629, p. 0–3, 2018.

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; YADAV, S. K. Microbial proteases: Detection, production, and genetic improvement. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 262–276, 2011.

KAUR, M.; AGGARWAL, N. K.; YADAV, A.; GUPTA, R.; PMK, A.; MKP, A. Evaluation of Ligninolytic Activity of Fungal Pathogens Isolated from *Parthenium weed*. **Advances in Zoology and Botany**, v. 4, n. 2, p. 23–29, 2016.

KHAN, M. S.; AHMED, S.; EVANS, A. E. V; CHADWICK, M. Methodology for Performance Analysis of Textile Effluent Treatment Plants in Bangladesh. **Chemical Engineering Research Bulletin**, v. 13, p. 61–66, 2009.

KIM, Y. K.; YOO, K.; KIM, M. S.; HAN, I.; LEE, M.; KANG, B. R.; LEE, T. K.; PARK, J. The capacity of wastewater treatment plants drives bacterial community structure and its assembly. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.

KNAPINSKA, A. M.; AMAR, S.; HE, Z.; MATOSEVIC, S.; ZYLBERBERG, C.; FIELDS G, B. Matrix metalloproteinases as reagents for cell isolation. **HHS Public Access. Physiology & behavior**, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2017.

KORZENIEWSKA, E.; FILIPKOWSKA, Z.; GOTKOWSKA-PŁACHTA, A.; JANCZUKOWICZ, W.; DIXON, B.; CZUŁOWSKA, M. Determination of emitted airborne microorganisms from a BIO-PAK wastewater treatment plant. **Water Research**, v. 43, n. 11, p. 2841–2851, 2009.

KUDDUS, M.; RAMTEKE, P. W. A cold-active extracellular metalloprotease from *Curtobacterium luteum* (MTCC 7529): Enzyme production and characterization. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 385–392, 2008.

KUHAD, R, C.; GUPTA, R., SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzym. Res.** 2011.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 411–456, 1999.

KUMAR, D.; SAVITRI, N.; THAKUR, R.; VERMA, R.; BHALLA, T, C. Microbial Proteases and Application as Laundry Detergent Additive. **Research Journal of Microbiology**. 661-672, 2008.

KUMAR, N, S.; DEVI, S, P, S.; NAIR, A, S. A review on microbial proteases. **International Journal of Advanced Research**. 4. 2048-2053, 2016.

KÜNZLER, M. How fungi defend themselves against microbial competitors and animal predators. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 9, p. 1–10, 2018.

LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 22:680 e5, 1970.

LEGODI, L. M.; LA GRANGE, D.; VAN RENSBURG, E. L. J.; NCUBE, I. Isolation of Cellulose Degrading Fungi from Decaying Banana *Pseudostem* and *Strelitzia alba*. **Enzyme Research**, 2019.

LELLIS, B.; FÁVARO-POLONIO, C. Z.; PAMPHILE, J. A.; POLONIO, J. C. Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, n. 2, p. 275–290, 2019.

LEO, V. V.; ZOTHANPUIA; LALTHAFALA; RAMESH, N.; SINGH, B. P. Microorganisms as an Efficient Tool for Cellulase Production: Availability, Diversity, and Efficiency. **Elsevier B.V.**, 2019.

LIANG, Y. L.; ZHANG, Z.; WU, M.; WU, Y.; FENG, J. X. Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of China and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

LIMA, C. A.; JÚNIOR, A. C. V. F.; FILHO, J. L. L.; CONVERTI, A.; MARQUES, D. A. V.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; PORTO, A. L. F. Two-phase partitioning and partial characterization of a collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* URM4622: Application to collagen hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 75, p. 64–71, 2013.

LIMA, M. T. N. S.; SANTOS, L. B. dos; BASTOS, R. W.; NICOLI, J. R.; TAKAHASHI, J. A. Antimicrobial activity and acetylcholinesterase inhibition by extracts from chromatin modulated fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 169–176, 2018.

LIU, S. H.; ZENG, G. M.; NIU, Q. Y.; LIU, Y.; ZHOU, L.; JIANG, L. H.; TAN, X. fei; XU, P.; ZHANG, C.; CHENG, M. Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: A mini review. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 25–33, 2017.

LIU, X.; ASHFORTH, E.; REN, B.; SONG, F.; DAI, H.; LIU, M.; WANG, J.; XIE, Q.; ZHANG, L. Bioprospecting microbial natural product libraries from the marine environment for drug discovery. **Journal of Antibiotics**, v. 63, n. 8, p. 415–422, 2010.

LIU, X.; KOKARE, C. Microbial Enzymes of Use in Industry. **Biotechnology of Microbial Enzymes**. Elsevier Inc. All rights reserved, 2017.

LIU, Y. J.; ZHANG, J. L.; LI, C.; MU, X. G.; LIU, X. L.; WANG, L.; ZHAO, Y. C.; ZHANG, P.; LI, X. D.; ZHANG, X. X. Antimicrobial Secondary Metabolites from the Seawater-Derived Fungus *Aspergillus sydowii* SW9. **Molecules**, 24, 4596, 2019.

LOPES, A. C.; BARBOSA, A. de M.; ROCHA, R. D. C.; CUNHA, M. A. A. da; PIZATO, E. Caracterização de efluente têxtil e avaliação da capacidade de remoção de cor utilizando o fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 22, n. 5, p. 1027–1035, 2017.

LOPES, E. M.; SIERRA, E. M. De. Screening Screening of Bacterial Isolates With Useful Alkaline Activity. I CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, AGRÍCOLA E AMBIENTAL (CBMAAA) , **Ciência & Tecnologia FATEC** – JB Jaboticabal – SP, v8, 2016.

LÓPEZ-MONDÉJAR, R.; ZÜHLKE, D.; BECHER, D.; RIEDEL, K.; BALDRIAN, P. Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 1–12, 2016.

MAIMETS, M.; BRON, R.; DE HAAN, G.; VAN OS, R.; COPPES, R. P. Similar ex vivo expansion and post-irradiation regenerative potential of juvenile and aged salivary gland stem cells. **Radiotherapy and Oncology**, v. 116, n. 3, p. 443–448, 2015.

MALLA, M. A.; DUBEY, A.; YADAV, S.; KUMAR, A.; HASHEM, A.; ABD-ALLAH, E. F. Understanding and designing the strategies for the microbe-mediated remediation of environmental contaminants using omics approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUN, 2018.

MARGOT, J.; BENNATI-GRANIER, C.; MAILLARD, J.; BLÁNQUEZ, P.; BARRY, D. A.; HOLLIGER, C. Bacterial versus fungal laccase: Potential for micropollutant degradation. **AMB Express**, v. 3, p. 1–30, 2013.

MATKAR, K.; CHAPLA, D.; DIVECHA, J.; NIGHOJKAR, A.; MADAMWAR, D. Production of cellulase by a newly isolated strain of *Aspergillus sydowii* and its optimization under submerged fermentation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 78, p. 24–33, 2013.

MATOS, F. R.; VASCONCELOS, R. G.; QUEIROZ, L. M. G.; DE ALMEIDA FREITAS, R. Expressão de MMPs, marcadores angiogênicos e proliferação celular em tumores odontogênicos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 5, p. 375–381, 2012.

MATUSZEWSKA, A. Microorganisms as Direct and Indirect Sources of Alternative Fuels. **Alternative Fuels, Technical and Environmental Conditions**, 2016.

MCCALLON, S. K.; WEIR, D.; LANTIS, J. C. Optimizing wound bed preparation with collagenase enzymatic debridement. **Journal of the American College of Clinical Wound Specialists**, v. 6, n. 1–2, p. 14–23, 2014.

MEDIE, F. M.; DAVIES, G. J.; DRANCOURT, M.; HENRISSAT, B. Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 227–234, 2012.

MEERBERGEN, K.; VAN GEEL, M.; WAUD, M.; WILLEMS, K. A.; DEWIL, R.; VAN IMPE, J.; APPELS, L.; LIEVENS, B. Assessing the composition of microbial communities in textile wastewater treatment plants in comparison with municipal wastewater treatment plants. **MicrobiologyOpen**, v. 6, n. 1, 2017.

MEIR, O.; ZAKNOON, F.; COGAN, U.; MOR, A. A broad-spectrum bactericidal lipopeptide with anti-biofilm properties. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

MENZ, J.; BAGINSKA, E.; ARRHENIUS, Å.; HAISS, A.; BACKHAUS, T.; KÜMMERER, K. Antimicrobial activity of pharmaceutical cocktails in sewage treatment plant effluent – An experimental and predictive approach to mixture risk assessment. **Environmental Pollution**, v. 231, p. 1507–1517, 2017.

MIENDA, B. S. Characterization of *Bacillus cereus* BM1 with Protease Activity. **Res Biotechnol**, n. June, 2013.

MISHRA, S. K.; SRIVASTAVA, S. K. Production of extracellular laccase from bacterial strain *Bacillus subtilis* MTCC 1039 using different parameter. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, 13(3), 1645–1650, 2016.

MLOT, CHRISTINE. Antibiotics in nature: Beyond biological warfare. **Science**. v 324 p.1637–926, 2009.

MÓDOLO, J. C. KOLLAGENASE®. CRISTÁLIA - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, 2020. Bula de remédio.

MOHAMED, H. A. L. A.; HAGGAG, W. M. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 181–191, 2006.

MOHAMMED, M. S. A.; TAWFIK, M. S. H.; IBRAHIM, A. E.-G. Influence of two extraction methods on essential oils of some *Apiaceae* family plants. **Egypt Pharmaceut J**, v. 18, p. 160–164, 2019.

MONCIARDINI, P.; IORIO, M.; MAFFIOLI, S.; SOSIO, M.; DONADIO, S. Discovering new bioactive molecules from microbial sources. **Microbial Biotechnology**, 7(3), 209–220, 2014.

MOON, R. J.; MARTINI, A.; NAIRN, J.; SIMONSEN, J.; YOUNGBLOOD, J. Cellulose nanomaterials review: Structure, properties and nanocomposites. **The Royal Society of Chemistry**, 40, 3941–3994, 2011.

MORE, S. S.; RENUKA, P. S.; PRUTHVI, K.; SWETHA, M.; MALINI, S.; VEENA, S. M. Isolation, purification, and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp. **Enzyme Research**, v. 2011, n. 1, p. 1–7, 2011.

MUTHUKRISHNAN, S. Optimization and Production of Industrial Important Cellulase Enzyme from *Penicillium citrinum* in Western Ghats of Sathuragiri Hills Soil Sample Isolate. **Universal Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 1, p. 7–16, 2017.

MUTHUKUMARASAMY, N. P.; JACKSON, B.; JOSEPH RAJ, A.; SEVANAN, M. Production of Extracellular Laccase from *Bacillus subtilis* MTCC 2414 Using Agroresidues as a Potential Substrate. **Biochemistry Research International**, 2015.

MUTHULAKSHMI, C.; GOMATHI, D.; KUMAR, D. G.; RAVIKUMAR, G.; KALAISELVI, M.; UMA, C. Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. **Jordan J. Biol. Sci.**, v. 4, n. 3, p. 137–148, 2011.

NAIR, S. G.; SINDHU, R.; SHASHIDHAR, S. Enzymatic bleaching of kraft pulp by xylanase from *Aspergillus sydowii* SBS 45. **Indian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 332–338, 2010.

NARAIAN, R.; GAUTAM, R. L. *Penicillium* Enzymes for the Saccharification of Lignocellulosic Feedstocks. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, P, 201–215, 2018.

NARDINI, E.; KISAND, V.; LETTIERI, T. Microbial Biodiversity and Molecular Approach. Aquatic microbial world and biodiversity: Molecular Approach to improve the knowledge. **JRC Scientific and Technical Reports, European Union**, 2010.

NARENDHIRAKANNAN, R. T.; MANNIVANNAN, A.; RATHORE, S. S. Screening of cellulase producing microorganisms from lake area containing water Hyacinth for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 5, n. 3, p. 23–30, 2014.

NAZIR, R.; SHEN, J. P.; WANG, J. T.; HU, H. W.; HE, J. Z. Fungal networks serve as novel ecological routes for enrichment and dissemination of antibiotic resistance genes as exhibited by microcosm experiments. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

NDLOVU, T.; RAUTENBACH, M.; VOSLOO, J. A.; KHAN, S.; KHAN, W. Characterisation and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a wastewater treatment plant. **AMB Express**, v. 7, n. 1, 2017.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.**, 70, 461–477, 2007.

NIELSEN, J. C.; GRIJSEELS, S.; PRIGENT, S.; JI, B.; DAINAT, J.; NIELSEN, K. F.; FRISVAD, J. C.; WORKMAN, M.; NIELSEN, J. Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals vast potential of secondary metabolite production in *Penicillium* species. **Nature Microbiology**, v. 2, n. April, 2017.

NIGAM, P. S. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. **Biomolecules**, v. 3, n. 3, p. 597–611, 2013.

NOVAKOVA, J.; FARKASOVSKY, M. Bioprospecting microbial metagenome for natural products. *Biologia (Poland)*, 68(6), 1079–1086, 2013.

OKE, N. Effluent Management in Textile Industry. **Trends in Textile Engineering & Fashion Technology**, v. 2, n. 3, p. 2–4, 2018.

OLIVEIRA, K. M. de; BOAS, E. V.; BONETT, L. P.; JÚNIOR, E. L. C.; BERNARDI-WENZEL, J. Isolamento e Atividade Antibacteriana de Fungos Endofíticos de *Piper glabratum* Kunth. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 19, n. 1, p. 3–9, 2015.

ORLANDELLI, R. C.; DE ALMEIDA, T. T.; ALBERTO, R. N.; POLONIO, J. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Antifungal and proteolytic activities of endophytic fungi

isolated from *Piper hispidum* Sw. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 359–366, 2015.

ORTIZ-VERA, M. P.; OLCANHESKI, L. R.; DA SILVA, E. G.; DE LIMA, F. R.; MARTINEZ, L. R. del P. R.; SATO, M. I. Z.; JAFFÉ, R.; ALVES, R.; ICHIWAKI, S.; PADILLA, G.; ARAÚJO, W. L. Influence of water quality on diversity and composition of fungal communities in a tropical river. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018.

OSUNMAKINDE, C. O.; SELVARAJAN, R.; MAMBA, B. B.; MSAGATI, T. A. M. Profiling bacterial diversity and potential pathogens in wastewater treatment plants using high-throughput sequencing analysis. **Microorganisms**, v. 7, n. 11, 2019.

OU, J. H.; LIN, G. C.; CHEN, C. Y. *Sarocladium* species associated with rice in Taiwan. **Mycological Progress**, v. 19, n. 1, p. 67–80, 2020.

OYEDEJI, O.; O. OJEKUNLE, O. Cellulase Production by *Penicillium citrinum* using Brewer's Spent Grain and Pineapple Peels as Cheap, Alternate Substrates. **International Journal of Sciences**, v. 4, n. 01, p. 74–83, 2018.

OZABOR, T. P.; FADAHUNSI, I. F. Antimicrobial Activity of *Bacillus Subtilis* Against Some Selected Food Borne Pathogens. **ACTA Scientific Microbiology** v. 2, n. 7, p. 89–95, 2019.

PAES, F. A.; HISSA, D. C.; ANGELIM, A. L.; PINTO, N. W.; GRANGEIRO, T. B.; MELO, V. M. . Diversity of a Chlorine-Resistant *Bacillus* Population Isolated from a Wastewater Treatment Station. **Water Environment Research**, v. 84, n. 3, p. 274–281, 2012.

PAL, G. K.; SURESH, P. V. Microbial collagenases: Challenges and prospects in production and potential applications in food and nutrition. **RSC Advances**, v. 6, n. 40, p. 33763–33780, 2016.

PANDEY, P. K.; KASS, P. H.; SOUPIR, M. L.; BISWAS, S.; SINGH, V. P. Contamination of water resources by pathogenic bacteria. **AMB Express**, v. 4, n. 1, p. 1–16, 2014.

PARK, M. S.; LEE, S.; OH, S. Y.; CHO, G. Y.; LIM, Y. W. Diversity and enzyme activity of *Penicillium* species associated with macroalgae in Jeju Island. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 10, p. 646–654, 2016.

PAYNE, C. M.; KNOTT, B. C.; MAYES, H. B.; HANSSON, H.; HIMMEL, M. E.; SANDGREN, M.; STÅHLBERG, J.; BECKHAM, G. T. Fungal cellulases. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 3, p. 1308–1448, 2015.

PEREIRA, W. E. S.; SILVA, R. R.; AMO, G. S.; RULLER, R.; KISHI, L. T.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; SILVA, R. A Collagenolytic Aspartic Protease from *Thermomucor indicaseudaticae* Expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, part of Springer Nature, 2020

PERON, G.; FERNANDES, F. F.; LANDGRAF, T. N.; MARTINEZ, R.; PANUNTO-CASTELO, A. Recombinant 60-kDa heat shock protein from *Paracoccidioides brasiliensis*: Is it a good antigen for serological diagnosis of paracoccidioidomycosis? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 4, p. 1–6, 2017.

PETERSON, R.; GRINYER, J.; NEVALAINEN, H. Secretome of the coprophilous fungus *Doratomyces stemonitis* C8, isolated from koala feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 11, p. 3793–3801, 2011.

PIMENTEL, P. S. S.; DE SOUZA, A. L.; ROSAS NASCIMENTO, A. T.; DE ANDRADE, E. V.; ASTOLFI-FILHO, S.; NUNES-SILVA, C. G. Endo and exoglucanases produced by *Penicillium citrinum* isolated from Amazon. **BMC Proceedings**, v. 8, n. S4, p. 3–4, 2014.

POTEMPA, A. J.; PIKE R, N. Corruption of Innate Immunity by Bacterial Proteases. **Journal of Innate Immunity**, v. 1, n. 2, p. 70–87, 2009.

PRATUSH, A.; GUPTA, A.; BHALLA, T. Microbial Proteases : Prospects and Challenges. **Microbiology Application**, n. February, p. 30–48, 2013.

PROMON, S. K.; KAMAL, W.; RAHMAN, S. S.; HOSSAIN, M. M.; CHOUDHURY, N. Ethanol production using vegetable peels medium and the effective role of cellulolytic bacterial (*Bacillus subtilis*) pre-treatment. **F1000 Research**, v. 7, n. May, p. 271, 2018.

PUNDIR, R. K.; MISHRA, V. K.; RANA, S.; LAKHANI, M. Screening of Laccase producing fungi from soil samples - An In Vitro Study. **Electronic Journal of Biology**, v. 12, n. 3, p. 254–257, 2016.

PUSHPANGADAN, P.; GEORGE, V.; PARAMBIL IJINU, T.; AMBIKA CHITHRA, M. Biodiversity, Bioprospecting, Traditional Knowledge, Sustainable Development and Value Added Products: A Review. **Journal of Traditional Medicine & Clinical Naturopathy**, v. 07, n. 01, p. 1–7, 2018.

QAISAR, S.; ZOHRA, R. R.; AMAN, A.; QADER, S. A. U. Enhanced production of cellulose degrading CMCase by newly isolated strain of *Aspergillus versicolor*. **Carbohydrate Polymers**, v. 104, n. 1, p. 199–203, 2014.

QIAN, Y.; ZHONG, L.; SUN, Y.; SUN, N.; ZHANG, L.; LIU, W.; QU, Y.; ZHONG, Y. Enhancement of Cellulase Production in *Trichoderma reesei* via Disruption of Multiple Protease Genes Identified by Comparative Secretomics. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. December, p. 1–12, 2019.

RAHIMI, T.; MOHAMMADI, R. Identification of Dermatophyte and Nondermatophyte Molds Isolated from Animal Lesions Suspected to Dermatomyces. **Advanced Biomedical Research**, 2020.

RASTOGI, M.; SHRIVASTAVA, S. Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, n. January, p. 330–340, 2017.

RATHOD, M. G.; PATHAK, A. P. Efficient decolorization of textile dyes by alkaline protease producing bacterial consortia. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**, v. 47, n. 7, p. 1468–1477, 2018.

RAUACUTE L, T. T.; DAISY, P. rez B.; RAFAEL, R. H.; ALBERTO, C. V.; GERARDO, R. M. oz; SARA, S. P. New laccase-producing fungi isolates with biotechnological potential in dye decolorization. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 50, p. 10134–10142, 2011.

RAZZAQ, A.; SHAMSI, S.; ALI, A.; ALI, Q.; SAJJAD, M.; MALIK, A.; ASHRAF, M. Microbial proteases applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. JUN, p. 1–20, 2019.

REDDY, K. V.; VIJAYALASHMI, T.; RANJIT, P.; RAJU, M. N. Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from pulp and paper mill effluent contaminated soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, n. December, p. 1–6, 2017.

REN, Z.; CHEN, J.; KHALIL, A. R. Zymography as a Research Tool in the Study of Matrix Metalloproteinase Inhibitors **Methods in Molecular Biology** v. 1626, n. 617, p. 25–31, 2017.

RODARTE, M. P.; DIAS, D. R.; VILELA, D. M.; SCHWAN, R. F. Atividade proteolítica de bactérias, leveduras e fungos filamentosos presentes em grãos de café (*Coffea arabica* L.). **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 33, n. 3, p. 457–464, 2011.

RODRIGUES, D. M.; SOUSA, A. J.; HAWLEY, S. P.; VONG, L.; GAREAU, M. G.; KUMAR, S. A.; JOHNSON-HENRY, K. C.; SHERMAN, P. M. Matrix metalloproteinase 9 contributes to gut microbe homeostasis in a model of infectious colitis. **BMC Microbiology**, v. 12, 2012.

RODRÍGUEZ-ROJAS, A.; RODRÍGUEZ-BELTRÁN, J.; COUCE, A.; BLÁZQUEZ, J. Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 293–297, 2013.

RYALL, B.; EYDALLIN, G.; FERENCI, T. Culture History and Population Heterogeneity as Determinants of Bacterial Adaptation: the Adaptomics of a Single Environmental Transition. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 3, p. 597–625, 2012.

SAARENHEIMO, J.; AALTO, S. L.; RISSANEN, A. J.; TIROLA, M. Microbial community response on wastewater discharge in boreal lake sediments. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. APR, p. 1–12, 2017.

SADHU, S.; MAITI, T. K. Cellulase production by bacteria: a review. **Br. Microbiol. Res. J.** 3, 235–258, 2013.

SANTANA, L. A. da P.; VAINSTEIN, M. H.; TOMAZETT, P. K.; SANTOS-SILVA, L. K.; GÓES, A. M.; SCHRANK, A.; SOARES, C. M. de A.; PEREIRA, M. Distinct chitinases are expressed during various growth phases of the human pathogen *Paracoccidioides Brasiliensis*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 3, p. 310–316, 2012.

SANTHI, R. Microbial production of protease by *Bacillus Cereus* using cassava waste water. **Pelagia Research Library European Journal of Experimental Biology**, v. 4, n. 2, p. 19–24, 2014.

SANTOS, A, J. G.; SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, n. September 2017, p. 253–262, 2018.

SARAVANAN, D.; SREE LAKSHMI, S. N.; SENTHIL RAJA, K.; VASANTHI, N. S. Biopolishing of cotton fabric with fungal cellulase and its effect on the morphology of cotton fibres. **Indian Journal of Fibre and Textile Research**, v. 38, n. 2, p. 156–160, 2013.

SAROJ, P.; P, M.; NARASIMHULU, K. Characterization of thermophilic fungi producing extracellular lignocellulolytic enzymes for lignocellulosic hydrolysis under solid-state fermentation. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, 2018.

SAVONIUS, O.; ROINE, I.; ALASSIRI, S.; TERVAHARTIALA, T.; HELVE, O.; FERNÁNDEZ, J.; PELTOLA, H.; SORSA, T.; PELKONEN, T. The Potential Role of Matrix Metalloproteinases 8 and 9 and Myeloperoxidase in Predicting Outcomes of Bacterial Meningitis of Childhood. **Mediators of Inflammation**, v. 2019, 2019.

SAWANT, A. M.; VANKUDOTH, R.; NAVALE, V.; KUMAVAT, R.; KUMARI, P.; SANTHAKUMARI, B.; VAMKUDOTH, K. R. Morphological and molecular characterization of *Penicillium rubens* sp.nov isolated from poultry feed. **Indian Phytopathology**, v. 72, n. 3, p. 461–478, 2019.

SETHI, S.; DATTA, A.; GUPTA, B. L.; GUPTA, S. Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil. **ISRN Biotechnology**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

SETTE, L. D.; PASSARINI, M. R. Z.; DELARMELINA, C.; SALATI, F.; DUARTE, M. C. T. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1185–1195, 2006.

SHAIKH, I. K.; DIXIT, P. P.; SHAIKH, T. M. Purification and characterization of alkaline soda-bleach stable protease from *Bacillus* sp. APP-07 isolated from Laundromat soil. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 273–279, 2018.

SHARKOVA, T. S.; KURAKOV, A. V.; OSMOLOVSKIY, A. A.; MATVEEVA, E. O.; KREYER, V. G.; BARANOVA, N. A.; EGOROV, N. S. Screening of producers of proteinases with fibrinolytic and collagenolytic activities among micromycetes. **Microbiology (Russian Federation)**, v. 84, n. 3, p. 359–364, 2015.

SHIMASAKI, C. Understanding Biotechnology Product Sectors. **Biotechnology Entrepreneurship**, 2014.

SHRADDHA; SHEKHER, R.; SEHGAL, S.; KAMTHANIA, M.; KUMAR, A. Laccase: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. **Enzyme Research**, v. 2011, n. 1, 2011.

SHUKLA, R. Studies on Bioactive Compounds from Different Microorganisms. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v. 6, n. 6, p. 1225–1233, 2015.

SILVA, C. F.; REIS, K. C.; LOPES, N. A.; BATISTA, L. R.; SCHAWN, R. F. Enzymatic and antagonistic potential of bacteria isolated from typical fruit of Cerrado in Minas Gerais State, Brazil. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 37, n. 3, p. 367, 2015.

SILVA, F. S.; ARAUJO, D. N.; LIMA, J. P. M. S.; DE REZENDE, A. A.; DA GRAÇA AZEVEDO ABREU, B. J.; DIAS, F. A. L. Análise da atividade enzimática de MMP-2 e 9 coletadas por swab em úlcera venosa de membro inferior. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 13, n. 3, p. 229–234, 2014.

SILVA, J. C.; FERNANDES, O.; MARTINS, M.; RODRIGUES JR, A.; TEIXEIRA, M. Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* mantidas sob duas condições de preservação. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, p. 48–54, 2010.

SILVA, R. R. Bacterial and Fungal Proteolytic Enzymes: Production, Catalysis and Potential Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 1, p. 1–19, 2017.

SILVA-BEDOYA, L. M.; SÁNCHEZ-PINZÓN, M. S.; CADAVID-RESTREPO, G. E.; MORENO-HERRERA, C. X. Bacterial community analysis of an industrial wastewater treatment plant in Colombia with screening for lipid-degrading microorganisms. **Microbiological Research**, v. 192, p. 313–325, 2016.

SINGH, D.; SRIVASTAVA, S. K.; CHAUDHURI, T. K.; UPADHYAY, G. Multifaceted role of matrix metalloproteinases (MMPs). **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 2, n. MAY, p. 1–5, 2015.

SINGH, N.; SINGH, J.; SINGH, K. Small at Size, Big at Impact: Microorganisms for Sustainable Development. **Microbial Bioprospecting for Sustainable Development**, p. 3–28, 2018.

SINGH, R. S.; SINGH, T.; PANDEY, A. Microbial Enzymes – An Overview. **Elsevier B.V.**, 2019.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. **Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.

SINGH, R.; MITTAL, A.; KUMAR, M.; MEHTA, P. K. Microbial Proteases in Commercial Applications. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences** v. 4, n. November, p. 365–374, 2016.

SINGH, S.; BAJAJ, B. K. Potential application spectrum of microbial proteases for clean and green industrial production. **Energy, Ecology and Environment**, v. 2, n. 6, p. 370–386, 2017.

SMERAGLIA, F.; DEL BUONO, A.; MAFFULLI, N. Collagenase clostridium histolyticum in Dupuytren's contracture: A systematic review. **British Medical Bulletin**, v. 118, n. 1, p. 149–158, 2016.

SOUTO, X. M.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. S. Chymotrypsin-and trypsin-like activities secreted by the multidrug-resistant yeasts forming the candida haemulonii complex. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 91, n. 3, 2019.

SOUZA, J.; LUND, G. R.; Martins, R. M. Metalloproteinases Secreted By Candida: a Systematic Review. **Enzyme Engineering**, v. 05, n. 01, p. 145–147, 2016.

SOUZA, P. M.; DE ASSIS BITTENCOURT, M. L.; CAPRARA, C. C.; DE FREITAS, M.; DE ALMEIDA, R. P. C.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M.; FILHO, E. X. F.; PESSOA JUNIOR, A.; MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337–346, 2015.

SOUZA, P. M.; DE ASSIS BITTENCOURT, M. L.; CAPRARA, C. C.; DE FREITAS, M.; DE ALMEIDA, R. P. C.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M.; FILHO, E. X. F.; PESSOA JUNIOR, A.; MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337–346, 2015.

SPEDA, J.; JONSSON, B. H.; CARLSSON, U.; KARLSSON, M. Metaproteomics-guided selection of targeted enzymes for bioprospecting of mixed microbial communities. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–17, 2017.

SRINIVASAN, P.; SELVANKUMAR, T.; KAMALA-KANNAN, S.; MYTHILI, R.; SENGOTTAIYAN, A.; GOVARTHANAN, M.; SENTHILKUMAR, B.; SELVAM, K. Production and purification of laccase by *Bacillus* sp. using millet husks and its pesticide degradation application. **3 Biotech**, v. 9, n. 11, p. 1–10, 2019.

STAATS, C. C.; KMETZSCH, L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Fungal zinc metabolism and its connections to virulence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, n. OCT, p. 1–7, 2013.

STAJICH, J. E.; BERBEE, M. L.; BLACKWELL, M.; HIBBETT, D. S.; JAMES, T. Y.; SPATAFORA, J. W.; TAYLOR, J. W. The Fungi. **Current Biology**, 19(18), R840–R845, 2009.

SUMATHI, T.; VISWANATH, B.; LAKSHMI, A. S.; SAIGOPAL, D. V. R. Production of Laccase by *Cochliobolus* sp. Isolated Low Molecular Weight PVC. **Biochemistry Research International**, v. 2016, p. 1–10, 2016.

SUN, J.; GUO, N.; NIU, L. L.; WANG, Q. F.; ZANG, Y. P.; ZU, Y. G.; FU, Y. J. Production of laccase by a new myrothecium verrucaria MD-R-16 isolated from pigeon pea and its application on dye decolorization. **Molecules**, v. 22, n. 4, 2017.

SVAHN, K. S.; GÖRANSSON, U.; EL-SEEDI, H.; BOHLIN, L.; LARSSON, D. G. J.; OLSEN, B.; CHRYSANTHOU, E. Antimicrobial activity of filamentous fungi isolated from highly antibiotic-contaminated river sediment. **Infection ecology & epidemiology**, v. 2, p. 1–6, 2012.

TAWIAH, A. A.; GBEDEMA, S. Y.; ADU, F.; BOAMAH, V. E.; ANNAN, K. Antibiotic producing microorganisms from River Wiwi, Lake Bosomtwe and the Gulf of Guinea at Doakor Sea Beach, Ghana. **BMC Microbiology**, v. 12, 2012.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 777–780, 1982.

THOMAS, L.; RAM, H.; SINGH, V. P. Inducible cellulase production from an organic solvent tolerant *Bacillus* sp. SV1 and evolutionary divergence of endoglucanase in different species of the genus *Bacillus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 429–442, 2018.

TIWARI, R.; NAIN, L.; LABROU, N. E.; SHUKLA, P. Bioprospecting of functional cellulases from metagenome for second generation biofuel production: a review. **Journal Critical Reviews in Microbiology**, v 44, 2018 - Issue 2, p 244-257, 2017.

TOTH, M.; SOHAIL, A.; FRIDMAN, R. Assessment of Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by Gelatin Zymography Metastasis Research Protocols. **Methods in Molecular Biology**, vol. 878, 2012.

TRACHE, D.; HUSSIN, M. H.; HAAFIZ, M. K. M.; THAKUR, V. K. Recent progress in cellulose nanocrystals: Sources and production. **Nanoscale**, v. 9, n. 5, p. 1763–1786, 2017.

TUOHETAHUNTILA, M.; SPEE, B.; KRUITWAGEN, H. S.; WUBBOLTS, R.; BROUWERS, J. F.; VAN DE LEST, C. H.; MOLENAAR, M. R.; HOUWELING, M.; HELMS, J. B.; VAANDRAGER, A. B. Role of long-chain acyl-CoA synthetase 4 in formation of polyunsaturated lipid species in hepatic stellate cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 2, p. 220–230, 2015.

UMAYAPARVATHI, S.; MEENAKSHI, S.; ARUMUGAM, M.; BALASUBRAMANIAN, T. Purification and characterization of protease from *Bacillus cereus* SU12 isolated from oyster *Saccostrea cucullata*. **African Journal of Biotechnology**. v. 12, n. 40, p. 5897–5908, 2013.

UNUOFIN, J. O.; OKOH, A. I.; NWODO, U. U. Recovery of laccase-producing gammaproteobacteria from wastewater. **Biotechnology Reports**, v. 21, 2019.

UPADHYAY, P.; SHRIVASTAVA, R.; AGRAWAL, P. K. Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2016.

UPADHYAY, P.; SHRIVASTAVA, R.; AGRAWAL, P. K. Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2016.

VÁCHOVÁ, L., MORAVCOVÁ, J. Two microassays for determination of a wide range of proteolytic activities using Azocoll as substrate. **Biochem Mol Biol Int** 30, 311-318, 1993.

VAN WART, H. E. Clostridium Collagenases. **Handbook of Proteolytic Enzymes**, v. 1, p. 607–611, 2013.

VIEGAS, C.; DIAS, R.; GOMES, A. Q.; MENESES, M.; SABINO, R.; VIEGAS, S. *Aspergillus flavus* contamination in two portuguese wastewater treatment plants. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 77, n. 14–16, p. 796–805, 2014.

VISHWANATHA, K. S.; APPU RAO, A. G.; SINGH, S. A. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 402–407, 2009.

WAKEFIELD, J.; HASSAN, H. M.; JASPARS, M.; EBEL, R.; RATEB, M. E. Dual induction of new microbial secondary metabolites by fungal bacterial co-cultivation. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUL, p. 1–10, 2017.

WANDERLEY, M. C. de A.; NETO, J. M. W. D.; FILHO, J. L. de L.; LIMA, C. de A.; TEIXEIRA, J. A. C.; PORTO, A. L. F. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 13–24, 2017.

WANDERLEY, M. C. de A.; NETO, J. M. W. D.; FILHO, J. L. de L.; LIMA, C. de A.; TEIXEIRA, J. A. C.; PORTO, A. L. F. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 13–24, 2017.

WANG, J. F.; LIN, X. P.; QIN, C.; LIAO, S. R.; WAN, J. T.; ZHANG, T. Y.; LIU, J.; FREDIMOSSES, M.; CHEN, H.; YANG, B.; ZHOU, X. F.; YANG, X. W.; TU, Z. C.; LIU, Y. H. Antimicrobial and antiviral sesquiterpenoids from sponge-associated fungus, *Aspergillus sydowii* ZSDS1-F6. **Journal of Antibiotics**, v. 67, n. 8, p. 581–583, 2014.

WANG, J.; ZHANG, L.; TENG, K.; SUN, S.; SUN, Z.; ZHONG, J. Cerecidins, novel lantibiotics from bacillus cereus with potent antimicrobial activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 8, p. 2633–2643, 2014.

WANG, W.J., HUANG, T.F., Purification and characterization of a novel metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. **Thromb Haemost.** 87, p 641-650. 2002.

WATT, A.J.; CURTIN, C. M. V.; HENTZ, R. Collagenase injection as nonsurgical treatment of Dupuytren's. **Year Book of Hand and Upper Limb Surgery**. 35A. 534–539, 2011.

WHO, World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Disponível em: <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/> 2017. Acesso em: 25 de setembro de 2019. Publication date: 27 February, 2017.

WIDYANINGSIH, S.; TRIANTO, A.; RADJASA, O. K.; WITTRIANSYAH, K. Antibacterial Activity Symbiotic Fungi of Marine Sponge *Axinella* sp., *Aspergillus Sydowii* on Four Growth Medium. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 116, n. 1, 2018.

XIONG, Z. Q.; WANG, J. F.; HAO, Y. Y.; WANG, Y. Recent advances in the discovery and development of marine microbial natural products. **Marine Drugs**, v. 11, n. 3, p. 700–717, 2013.

YADAV, A. N.; VERMA, P.; KUMAR, V.; SANGWAN, P.; MISHRA, S.; PANJIAR, N.; GUPTA, V. K.; SAXENA, A. K. Biodiversity of the Genus *Penicillium* in Different Habitats. **Elsevier B.V.**, 2018.

YADAV, S. K.; BISHT, D.; TIWARI, S.; DARMWAL, N. S. Purification, biochemical characterization and performance evaluation of an alkaline serine protease from *Aspergillus flavus* MTCC 9952 mutant. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 667–677, 2015.

YAN, S.; SUN, X.; ZHANG, W.; ZHU, L. Isolation, identification and cellulase-producing condition optimization of *Bacillus subtilis* Q3 strain. **AIP Conference Proceedings**, v. 2110, n. June, 2019.

YEH, Y. H.; KIRSCHNER, R. *Sarocladium spinificis*, a new endophytic species from the coastal grass *Spinifex littoreus* in Taiwan. **Botanical Studies**, v. 55, n. 1, p. 1–6, 2014.

YIKE, I. Fungal Proteases and Their Pathophysiological Effects. **Mycopathologia**, v. 171, n. 5, p. 299–323, 2011.

YU, D. S.; SONG, G.; SONG, L. L.; WANG, W.; GUO, C. H. Formaldehyde degradation by a newly isolated fungus *Aspergillus* sp. HUA. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, n. 1, p. 247–254, 2015.

YUAN, X.; MITCHELL, B. M.; WILHELMUS, K. R. Expression of matrix metalloproteinases during experimental *Candida albicans* keratitis. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 50, n. 2, p. 737–742, 2009.

ZAMANI, H.; SALEHZADEH, A.; ABDOLHOSSEINI, M. Isolation and molecular identification of a cellulotic bacterium from municipal waste and investigation of its cellulase production. **Bioscience Journal**, v. 34, n. 3, p. 761–768, 2018.

ZANPHORLIN, L. M.; CABRAL, H.; ARANTES, E.; ASSIS, D.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A.; DA-SILVA, R.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 2137–2143, 2011.

ZHANG, B.; XU, X.; ZHU, L. Activated sludge bacterial communities of typical wastewater treatment plants: distinct genera identification and metabolic potential differential analysis. **AMB Express**, v. 8, n. 1, 2018.

ZHANG, X.-Z.; ZHANG, Y.-H. P. Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications. **Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers**, p. 131–146, 2013.

ZHEZHOVA, S.; RISTESKI, S.; SASKA, G. Methods for waste waters treatment in textile industry. **International Scientific Conference “UNITECH 2014”**, n. November, p. III-248-III-252, 2014.

ZUPANČIČ, J.; BABIČ, M. N.; ZALAR, P.; GUNDE-CIMERMAN, N. The black yeast *Exophiala dermatitidis* and other selected opportunistic human fungal pathogens spread from dishwashers to kitchens. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–29, 2016.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRAÇÃO LATINO-AMERICANA
INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
CENTRO INTERDISCIPLINAR DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

ANEXO IV DO EDITAL PPG-BC Nº. 07/2019
TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA DIVULGAÇÃO E PUBLICAÇÃO DE
TRABALHOS ACADÊMICOS, ARTIGOS E DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Eu, Suzan Prado Fernandes Bernal, nacionalidade brasileira, CPF nº. 092.956.399-95, documento de identidade RG nº. 10.606.982-4, emitido pela SSP/PR, aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPG-BC), **AUTORIZO** a Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), a disponibilizar *on-line* meus trabalhos acadêmicos, artigos e dissertação de mestrado intitulada "*Fatores maternos e ambientais associados às anomalias congênitas em Foz do Iguaçu, PR*", podendo também ser acessado através da página eletrônica <<https://portal.unila.edu.br/mestrado/biociencias/>>, bem como pelas demais plataformas oficiais da UNILA e da CAPES, sem qualquer ônus para a UNILA, respeitados os direitos autorais, conforme Portaria CAPES nº. 013, de 15/02/2006.

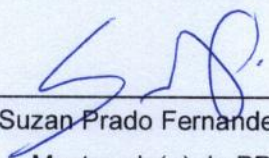
Informação de acesso ao documento:

Liberação para publicação a partir de 31/12/2020.

Em caso de prerrogativa de publicação, justifique:

*Os resultados da dissertação serão publicados e
republicados nos sites divulgados*

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná, 27 de fevereiro de 2020.


Suzan Prado Fernandes Bernal
Mestrando(a) do PPG-BC
(UNILA)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRAÇÃO LATINO-AMERICANA
BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA

Declaração junto ao curso de mestrado, do Programa de Pós-Graduação em Biociências (PPG-BC) e Biblioteca da UNILA

Foz do Iguaçu, 27 de fevereiro de 2020

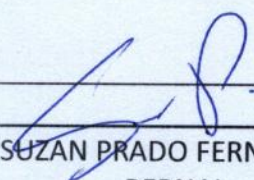
Venho pelo presente confirmar a submissão da **dissertação** intitulada "Avaliação do potencial biotecnológico de bactérias e fungos isolados de uma estação de tratamento de indústria têxtil", da mestranda **Suzan Prado Fernandes Bernal**, matrícula número 2018101000006832, sob orientação do **Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini** (UNILA), do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza (ILACVN), da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), no Repositório Institucional da UNILA (RI-UNILA).

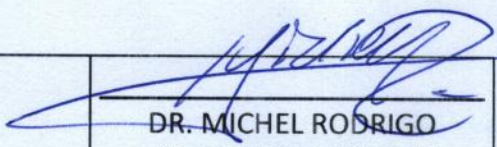
Períodos de embargo: 27/02/2020 a 30/12/2020.

E-mail de contato

- **autor/a:** <suzanfernandes1@hotmail.com> e <spf.bernal.2017@aluno.unila.edu.br>
- **orientador/a:** <michel.passarini@unila.edu.br>
- **coorientador/a:** Não há.

Nota explicativa: existindo períodos de embargo, (estes só se aplicam ao acesso e não ao depósito), ou seja, o depósito será sempre realizado, ficando o **texto integral em acesso restrito** e os seus metadados descritivos (título, autores, resumo, referências) em acesso público.


SUZAN PRADO FERNANDES
BERNAL


DR. MICHEL RODRIGO
ZAMBRANO PASSARINI
SIAPE 2190985