

Lívia de Carvalho Fontes

Isolamento e seleção de fungos com potencial para biorremediação a partir de ambientes aquáticos com histórico de contaminação por metais pesados

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

São Paulo
2015

Lívia de Carvalho Fontes

Isolamento e seleção de fungos com potencial para biorremediação a partir de ambientes aquáticos com histórico de contaminação por metais pesados

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração:
Microbiologia

Orientado: Prof. Dr. Benedito Corrêa

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Fontes, Lívia de Carvalho.

Isolamento e seleção de fungos com potencial para biorremediação a partir de ambientes aquáticos com histórico de contaminação por metais pesados / Lívia de Carvalho Fontes. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Corrêa.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Biorremediação.

Versão do título para o inglês: Isolation and selection of fungi with potential to bioremediation from aquatic environments contaminated with heavy metal.

1. Biorremediação 2. Fungos 3. Metais pesados 4. Melhoramento genético 5. Fitoquelatinas I. Corrêa, Prof. Dr. Benedito II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0198/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Livia de Carvalho Fontes.

Título da Tese: Isolamento e seleção de fungos com potencial para biorremediação a partir de ambientes aquáticos com histórico de contaminação por metais pesados.

Orientador(a): Prof. Dr. Benedito Corrêa.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 519/12 referente ao projeto intitulado: *"Isolamento e seleção de fungos com potencial para biorremediação a partir de ambientes aquáticos (sedimentos) contaminado com metais pesados e organoclorados"* sob a responsabilidade de **Livia de Carvalho Fontes**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 10 de abril de 2012.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Dedico esse trabalho
aos meus pais pelo apoio
e ensinamentos infinitos

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por iluminar meus caminhos;

Aos meus pais e meus irmãos pela presença mesmo que distante, acreditando sempre no meu trabalho;

Ao Felipe, pela ajuda e muitas horas de paciência;

Ao professor Benedito, pela atenção, colaboração científica, as conversas e apoio e sobretudo por acreditar no meu potencial e no meu trabalho;

Aos meus amigos do laboratório (Liliana, Cynara, Tati, Gabi, Ney, Karim, Lorena, Rodrigo, Sabina, Vinícius...);

Ao Professor Mario Henrique, pelo grande auxílio;

Ao Professor Wellingtone Raíssa pela disponibilidade;

Às secretárias do Programa de Pós Graduação em Microbiologia em especial à Gisele;

Aos funcionários da Biblioteca pela atenção e correção;

À FAPESP pelo auxílio financeiro;

À Capes pelo auxílio financeiro no início do projeto;

À minha grande e querida amiga Jacinta pelas muitas conversas e pensamentos positivos contagiantes;

Tios, tias e primos pela torcida sempre;

À CETESB pela parceria e pelo fornecimento das amostras.

Minha gratidão

"Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente.

Quem sobrevive é o mais disposto à mudança"

Charles Darwin

RESUMO

FONTES, L. C. **Isolamento e seleção de fungos com potencial para biorremediação a partir de ambientes aquáticos com histórico de contaminação por metais pesados.** 2015. 91f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A pesquisa em biorremediação está em crescente desenvolvimento. Muitos processos estão sendo desenvolvidos a fim de recuperar áreas contaminadas por metais pesados, entretanto microrganismos possuem maneiras mais ecologicamente indicadas para remoção, imobilização ou transformação de poluente. A existência de uma área contaminada por metais pesados pode gerar problemas sérios, como danos a saúde e comprometimento da qualidade dos recursos hídricos. No Brasil, a poluição do ambiente aquático tem resultado em grande poluição dos rios, lagos, represas, e dentre os elementos poluentes temos os metais pesados, que são elementos extremamente recalcitrantes. Segundo relatórios preparados pela CETESB, a ocorrência deste tipo de contaminação apresenta uma frequência alta no ambiente aquático. Assim, estudos que caracterizam fungos com capacidade de degradação destes poluentes, se fazem necessários. Assim sendo, o objetivo geral desse trabalho foi isolar e caracterizar espécies fúngicas em ambientes aquáticos contaminados por metais pesados e realizar a inserção de genes exógenos ao DNA de fungo, a fim de obter maior capacidade de absorção de metais pesados em sua superfície celular. Um total de 340 isolados fúngicos resistentes a quatro diferentes metais pesados (Chumbo, Cádmio, Cromo e Mercúrio) foram selecionados através de prévio *screening*. A identificação dos isolados foi dada através de metodologia clássica como exame direto e microcultivo, além de seqüenciamento do gene ITS. Entre os fungos filamentosos isolados (n=262), o gênero *Penicillium* foi o mais numeroso (n=51) seguido de *Trichoderma* (n=27), *Aspergillus* (n=20), *Fusarium* (n=14) e *Cladosporium* (n=8). Alguns fungos filamentosos (n=108) não foram possíveis serem identificados por metodologias clássicas como exame direto e microcultivo sendo denominados FNE (fungo não esporulado). Dentre os isolados, 78 isolados foram identificados como leveduras. Dentre os fungos leveduriformes identificados mais frequentemente, encontra-se o gênero *Rhodotorula* (n=12), seguidos de *Candida* (n=3), e *Cryptococcus* (n=3). Os isolados foram testados quanto a sua velocidade de crescimento radial (VCR) em meios suplementados com altas concentrações de metais pesados. As cepas que obtiveram maior velocidade de crescimento radial frente a cada um dos metais pesados foram uma cepa de *Trichoderma* sp. apresentando um VCR de 0,9cm/dia (Pb), VCR de 0,7cm/dia (Cd), VCR de 0,8cm/dia e VCR de 0,9cm/dia (Hg). *Curvularia afinis* apresentou uma VCR de 0,3cm/dia; Uma cepa do gênero *Penicillium* apresentou alta VCR na maior concentração testada que foi de 0,26cm/dia na concentração de 0,5g/L de Cádmio; Um fungo do gênero *Aspergillus* apresentou VCR de 0,42cm/dia e o fungo *Microsphaeropsis arundinis* apresentou VCR de 0,24 cm/dia. A cepa que apresentou melhor capacidade de retenção de metal pesado (*Trichoderma harzianum*) foi observada em microscópio eletrônico de transmissão e observado a capacidade desta de reter metais pesados tanto na superfície celular como no seu interior. Uma cepa de *Saccharomyces*

cerevisiae foi transformada com o gene sintético EC20 que codifica uma fitoquelatina sintética para aumento da capacidade de retenção de metais pesados mostrando por Microscopia Eletrônica de Transmissão a capacidade aumentada da cepa transformada.

Palavras-chave: Biorremediação. Metais pesados. Fungos. Melhoramento Genético. Fitoquelatina

ABSTRACT

FONTES, L. C. **Isolation and selection of fungi with potential for bioremediation of contaminated environmental by heavy metals.** 2015. 91p. Ph. D. thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The research on bioremediation is in constant development. Many processes are being developed in order to recover areas contaminated by heavy metals, microorganisms have however indicated more environmentally ways for removal, immobilization or transformation of pollutant. The existence of an area contaminated by heavy metals can cause serious problems, such as health damage and impaired quality of water resources. In Brazil, the pollution of the aquatic environment has resulted in serious pollution of rivers, lakes, dams, and from the polluting elements have heavy metals, which are extremely recalcitrant elements. According to reports prepared by CETESB, the occurrence of this type of contamination has a high frequency in the aquatic environment. Thus, studies that characterize fungi with degradation capacity of these pollutants, are needed. Thus, the aim of this study was to isolate and characterize fungal species in aquatic environments contaminated by heavy metals and make insertion of exogenous genes to fungal DNA, to obtain a greater capacity of absorbing heavy metals into their cell surface. A total of 340 fungal isolates resistant to four different heavy metals (Lead, Cadmium, Chromium and Mercury) were selected through prior screening. The identification of the isolates was given by classical methods such as direct examination and microcultivation, and sequencing of ITS gene. Among the filamentous fungal isolates (n = 262), *Penicillium* was the most numerous (n = 51) followed by *Trichoderma* (n = 27), *Aspergillus* (n = 20), *Fusarium* (n = 14), *Cladosporium* (n = 8). Some filamentous fungi (n = 108) were not possible be identified by classical methods such as direct examination and microcultivation being called FNE (not sporulated fungus). Among the isolates, 78 isolates were identified as yeasts. Among the most commonly identified fungal yeast, is the genus *Rhodotorula* (n = 12), followed by *Candida* (n = 3), and *Cryptococcus* (n = 3). The isolates were tested for their radial growth rate (VCR) in medium supplemented with high concentrations of heavy metals. Strains that obtiverammaior radial growth rate against each of the heavy metals were a strain of *Trichodermasp.* having a VCR 0,9cm / day (Pb), VCR 0.7cm / day (Cd), VCR 0.8cm / day and VCR 0,9cm / day (Hg). *Curvularia afinis* presented a VCR 0.3 cm / day; A strain of *Penicillium* showed high VCR in the highest concentration which was 0,26cm / day at a concentration of 0.5 g / L of cadmium; A fungus of the genus *Aspergillus* presented VCR 0,42cm / day and the fungus had VCR *arundinis* *Microsphaeropsis* 0.24 cm / day. The strain showed the best heavy metal retention capacity (*Trichoderma harzianum* was observed in a transmission electron microscope and observing the ability of this to retain heavy metals in both the cell surface and in its interior. A strain of *Saccharomyces cerevisiae* was transformed with the synthetic gene EC20 encoding a synthetic phytochelatin to increase heavy metals retention.

Keywords: Bioremediation. Heavy metals. Fungi. Genetical Enhancement. Phytochelatin

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag⁺ - prata

ArsB – sistema de efluxo de arsenito

As³⁺ - arsênio

AsO₄⁻³ – arsenito

ATCC - American Type Culture Collection

Au³⁺ - ouro

Bi³⁺ - bismuto

Cd²⁺ - cádmio

Cu²⁺ - cobre

czc - operon de resistência a cádmio, zinco e cobalto

EC - Fitoquelatina sintética

EC20sp – Gene da fitoquelatina sintética com 20 resíduos de cisteína

E. coli - Escherichia coli

Fe²⁺ - ferro

GSH - glutationa

Hg²⁺ - mercúrio

Mn²⁺ - manganês

Mo²⁺ – molibdênio

MT - Metalotioneína

NCBI - National Center for Biotechnology Information

Ni²⁺ - níquel

ONU - Organização das Nações Unidas

PC - Fitoquelatina natural

Pb²⁺ - chumbo

P. aeruginosa - Pseudomonas aeruginosa

Sb⁺³ - antimônio

Se⁰ - selênio metálico

Tl⁺¹ - tálio

U⁺² - urânio

V⁺² - vanádio

X-Gal - 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactopiranosídeo

W⁺² - tungstênio

Zn⁺² - zinco

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1- Íons de metais pesados, efeitos, fontes poluidoras e nível máximo..... | 22 |
| Tabela 2- Classificação dos Metais..... | 23 |
| Tabela 3- Pontos de Coleta de água e sedimento durante o período de um ano. | 39 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Efluente contaminado por cromo de origem industrial | 27 |
| Figura 2- Classificação das UGRHI's (Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos). | 37 |
| Figura 3 - Coleta de amostras (a) Coleta de Sedimento; (b) coleta de água; (c) acondicionamento das amostras | 37 |
| Figura 4 - Mapa da UGRHIs 6 | 38 |
| Figura 5 - Mapa da UGRHI 10 | 38 |
| Figura 6 - Leitura diária dos raios esquematizado | 42 |
| Figura 7 - Vetores de transformação (a) TIp351-EC20; (b) YCp22-EC20 | 44 |
| Figura 8 - Vetor de transformação pFAT | 47 |
| Figura 9 - Quantidade de fungos isolados por bimestre | 51 |
| Figura 10 - Quantidade de fungos isolados por ponto de amostragem | 52 |
| Figura 11 - Prevalência de fungos do gênero <i>Trichoderma</i> | 54 |
| Figura 12 - Espécies resistentes à maior concentração de Chumbo testada | 55 |
| Figura 13 - Espécies resistentes à maior concentração de Cádmiio testada | 56 |
| Figura 14 - Espécies resistentes à maior concentração de Cromo testada | 57 |
| Figura 15 - Espécies resistentes à maior concentração de Mercúrio testada | 58 |
| Figura 16 – Microscopia Eletrônica de cepa de <i>Trichoderma harzianum</i> | 59 |
| Figura 17 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (a) antes e (b) depois da transformação do <i>S. cerevisiae</i> frente ao Chumbo | 60 |
| Figura 18 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (a) antes e (b) depois da transformação do <i>S. cerevisiae</i> frente ao Cádmiio | 60 |
| Figura 19 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (a) antes e (b) depois da transformação do <i>S. cerevisiae</i> frente ao Cromo | 61 |
| Figura 20 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (a) antes e (b) depois da transformação do <i>S. cerevisiae</i> frente ao Mercúrio | 61 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 18 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 20 |
| 2.1 Problemas Ambientais | 20 |
| 2.2 Metais Pesados | 21 |
| 2.2.1 Chumbo | 24 |
| 2.2.2 Cádmio | 25 |
| 2.2.3 Cromo | 26 |
| 2.2.4 Mercúrio | 28 |
| 2.3 Biorremediação | 30 |
| 2.4 Fungos(leveduras e filamentosos) | 32 |
| 2.5 Melhoramento Genético (gene EC20) | 33 |
| 3 OBJETIVOS | 35 |
| 3.1 Objetivos específicos | 35 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 36 |
| 4.1 Amostragem | 36 |
| 4.2 Identificação macromorfológica e micromorfológica | 40 |
| 4.3 Identificação molecular dos fungos | 40 |
| 4.3.1 Extração do DNA | 40 |
| 4.3.2 Amplificação da região ITS pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) | 40 |
| 4.3.3 Purificação dos fragmentos amplificados | 41 |
| 4.3.4 Sequenciamento da região ITS | 41 |
| 4.4 Determinação da velocidade de crescimento radial frente aos íons de metais pesados | 41 |
| 4.5 Transformação Genética de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 43 |
| 4.5.1 Desenho dos iniciadores específicos | 43 |
| 4.5.2 Eletrodiluição | 43 |
| 4.5.3 Preparo de <i>Escherichia coli</i> competentes | 43 |
| 4.5.4 Transformação de <i>E.coli</i> competentes | 44 |
| 4.5.5 Mini-Prep | 44 |
| 4.5.6 Digestão do plasmídeo de <i>E.coli</i> | 45 |
| 4.5.7 Extração de pDNA de bactéria – Triton – prep (media escala) | 45 |

| | |
|--|----|
| 4.5.8 Transformação de leveduras | 45 |
| 4.6. Transformação de <i>Trichoderma</i> sp. por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 46 |
| 4.6.1 Teste de sensibilidade das cepas de <i>Trichoderma</i> sp. frente à higromicina B | 46 |
| 4.6.2 Cepas de <i>A. tumefaciens</i> vetor de transformação | 46 |
| 4.6.3 Transformação genética de <i>T.</i> por <i>A. tumefaciens</i> | 47 |
| 4.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão | 49 |
| 4.7.1 Preparo das amostras para a microscopia eletrônica de transmissão (MET) | 49 |
| 5 RESULTADOS..... | 51 |
| 5.1 Isolamento e identificação de fungos | 51 |
| 5.2 Avaliação da resistência e velocidade de crescimento radial dos fungos frente aos íons de metais pesados | 53 |
| 5.3 Transformação Genética de <i>S. cerevisiae</i> | 59 |
| 5.4 Transformação Genética de <i>Trichoderma</i> sp. | 59 |
| 5.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão | 59 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 62 |
| 7 CONCLUSÕES | 67 |
| REFERÊNCIAS | 69 |
| APÊNDICE..... | 75 |
| ANEXO A | 83 |
| ANEXO B..... | 85 |
| ANEXO C | 87 |

1 INTRODUÇÃO

A preservação e recuperação do meio ambiente é hoje uma grande preocupação. O desenvolvimento industrial, que é o maior causador dos problemas relacionados à poluição e contaminação ambiental, ocorreu de forma muito acelerada a partir da revolução industrial. A partir daí, a emissão de tais fontes contaminantes no ambiente provenientes de atividades industriais aumentou de forma descontrolada. Em se tratando do Estado de São Paulo, a falta de planejamento prévio estratégico seguido pelo crescimento acelerado, resultando na instalação de indústrias em áreas que passaram a ser altamente urbanizada. Ao mesmo tempo, uma política de gerenciamento ambiental, principalmente, nas décadas de 60 a 90 era muito falha, originando áreas super contaminadas por diversas substâncias tóxicas, geralmente, colocando em risco a saúde da comunidade próxima a estes locais (COLLA, 2008).

No Brasil, os rios que cortam as grandes cidades são muitas vezes afetados por atividades antropogênicas. Em São Paulo, o rio Tietê é um exemplo disto. Além disso, represas (como a Billings) localizadas na região metropolitana vêm apresentando ao longo dos anos problemas graves de poluição. O rio Tietê conta com aproximadamente 1.100 km de extensão, sendo considerado o rio mais importante de todo Estado de São Paulo devido ao seu grande potencial hidroelétrico que é bem explorado em quase toda a sua extensão. Com o aumento da população e das indústrias na cidade de São Paulo, o rio Tietê se tornou um dos rios mais poluídos do mundo, sendo frequentemente alvo de esgotos tanto domésticos quanto industriais, deteriorando cada vez mais a qualidade de suas águas e sedimentos (MORTATTI et al., 2002). Os metais pesados estão presentes entre os principais poluentes originários dessas atividades causadas pelo homem (SILVA, 2009).

Em países onde a água não é um recurso tão abundante como no Brasil, muitas vezes o efluente de esgoto pode contribuir com parcela substancial do fluxo dos rios. Assim sendo, a remoção destes compostos altamente tóxicos tais como os metais pesados presentes nas nas estações de tratamento de esgotos em águas residuárias é de suma importância uma vez que impede que as concentrações de tais compostos tóxicos presentes no efluente extrapolem as concentrações permitidas pelos padrões de emissão causando impactos negativos nos corpos receptores (MORTATTI et al., 2002).

As grandes quantidades de espumas de rios poluídos também contribuem significativamente com a poluição, uma vez que estas são ricas em material particulado e metais pesados como cobre, chumbo, níquel e cádmio, por exemplo (BARKAY, 2003). Estas concentrações de metais pesados nas espumas do rio Tietê superam os valores em 20 a 188

vezes aos observados na água (FRANKLIN, 2010). Esses metais pesados podem ser provenientes de efluentes industriais não tratados previamente antes de serem descartados nas águas do rio e apesar de seus efeitos serem menos visíveis, seus impactos são muito mais difíceis de serem remediados, pois é pouco conhecida a resposta dos ecossistemas naturais à exposição crônica a esse grupo de contaminantes que não são degradáveis, acumulando-se progressivamente nos ecossistemas naturais e afetando seu funcionamento durante décadas ou até mesmo séculos (FRANKLIN, 2010).

No caso da represa Billings (reservatório do Rio Grande), que durante muitos anos recebeu água proveniente de um desvio do rio Tietê, tem um histórico de contaminação por mercúrio, inviabilizando completamente o uso de suas águas para atividades como consumo, irrigação, cultivo e recreação (FRANKLIN, 2010).

Os metais pesados são elementos altamente reativos e bioacumuláveis nos organismos vivos ao longo de toda cadeia trófica. Assim sendo, dentre os vários poluentes existentes, os metais pesados têm recebido atenção especial, uma vez que alguns deles são extremamente tóxicos para uma grande variedade de organismos, mesmo em concentrações muito baixas (GAAD, 2009; VALDMAN; LEITE, 2000). Por isso tem sido grande o interesse nos metais pesados com relação à sua composição química, efeitos biológicos, destino no ambiente e seu controle. Os metais pesados presente nas águas residuárias são originados a partir de atividades industriais, comerciais e domésticas, o que faz com que seja inevitável a sua presença no ambiente aquático (ZABEL, 1993). Contudo, a prevenção da poluição, a limpeza e/ou remediação de áreas contaminadas tornou-se, nos últimos anos, uma das prioridades ambiental.

As indústrias estão sendo impelidas a introduzirem novas técnicas ou tecnologias de purificação e reciclagem, com propósito de reduzir consideravelmente a contaminação no ecossistema. Dentre as inúmeras tecnologias para remediação de águas e solos contaminados, destaca-se a biorremediação como opção para promover a detoxificação do local ou a remoção dos elementos contaminados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Problemas Ambientais

Pode ser definida como uma área contaminada, local ou terreno onde há comprovadamente poluição ou contaminação causada pela introdução de quaisquer substâncias e/ou resíduos que nela tenham sido depositados, acumulados, armazenados, enterrados ou infiltrados de forma planejada, acidental ou natural.

Os poluentes ou contaminantes podem ser transportados propagando-se por diferentes vias, como o ar, o solo, as águas subterrâneas e superficiais, alterando suas características naturais de qualidade.

Segundo a Política Nacional do Meio Ambiente (Lei 6.938/81), são considerados bens a proteger: a saúde e o bem-estar da população; a fauna e a flora; a qualidade do solo, das águas e do ar; os interesses de proteção à natureza/paisagem; a ordenação territorial e planejamento regional e urbano; a segurança e ordem pública.

A boa qualidade da natureza está intrinsecamente ligada à qualidade de vida no planeta Terra. Os diversos locais contaminados geralmente são resultado de atividades industriais do passado, no tempo em que a consciência da saúde e efeitos ambientais relacionadas com a produção, uso e descarte de substâncias nocivas ainda não eram muito bem estudados e difundidos. O problema agora é de alcance mundial e a estimativa do número de locais contaminados é significativa (CAIRNEY, 1993).

No Brasil, os diversos corpos d'água são frequentemente afetados por atividades antropogênicas tais como atividades industriais e agrícolas. Tais atividades ultrapassam a capacidade autodepurativa dos corpos d'água que não conseguem eliminar ou pelo menos minimizar as concentrações de tais poluentes.

Muitas vezes, é possível isolar microrganismos resistentes aos metais pesados presentes em locais contaminados por metais pesados. A resistência e a eficiência de tais microrganismos para a remoção de metais pesados variam grandemente (JOSHI et al., 2011).

Grandes avanços foram feitos até os dias de hoje no sentido de desenvolvimento industrial, que indubitavelmente, tem melhorado as condições de vida e conforto do ser humano, entretanto, tem inadvertidamente perturbado o equilíbrio ambiental fundamental estabelecido pela natureza. A poluição ambiental e os esforços humanos para a melhoria dos padrões de vida são como as duas faces de uma mesma moeda. Com a industrialização e

consequente urbanização o meio ambiente está sendo poluído continuamente (DHANKHAR; HOODA, 2011).

Em geral, os contaminantes da água podem ser orgânicos e inorgânicos . Poluentes da água orgânicos incluem solventes industriais , compostos orgânicos voláteis , inseticidas, pesticidas e resíduos de processamento de alimentos , etc. Compostos orgânicos são possíveis de serem degradados pelos microrganismos. Já os contaminantes inorgânicos da água incluindo os metais são recalcitrantes, isto é, persistentes no ambiente (DHANKHAR; HOODA, 2011).

A presença de íons metálicos em efluentes industriais é extremamente indesejável, visto que são tóxicos tanto para organismos superiores como também para microrganismos. Metais pesados tais como chumbo, cádmio, cromo (VI) e mercúrio, são considerados como muito tóxicos, enquanto que outros, tais como o cobre, níquel, cobalto e zinco, não são tão tóxicos, mas seu uso extensivo e concentrações crescentes no ambiente são de grande preocupação. Os radionuclídeos tal como o urânio, possuem elevada toxicidade além de serem radioativos, e apresentam uma ameaça séria, mesmo em pequenas concentrações. Por causa do aumento da aplicação em natureza imutável de metais pesados, a poluição resultante tornou-se um dos mais graves problemas ambientais atualmente. Portanto, a necessidade de uma compreensão completa dos efeitos nocivos causados pela liberação de metais tóxicos no meio ambiente e do surgimento de proteção ambiental têm incentivado estudos sobre a remoção/recuperação destes metais pesados usando novas tecnologias que não impactam o meio ambiente (DHANKHAR; HOODA, 2011).

2.2 Metais Pesados

Os metais pesados são os elementos químicos que apresentam densidade maior que 5g/cm^3 (NIRIAGU, 1992). Além de serem elementos reativos e bioacumuláveis nos organismos vivos, os metais pesados tem potencial intoxicante altíssimo. Acredita-se que os metais sejam os agentes tóxicos mais antigos conhecidos pelo homem.

Há aproximadamente 2.000 anos a.C., grandes quantidades do metal chumbo eram obtidas como subproduto da fusão da prata. Todas as formas de vida são afetadas pela presença de metais dependendo da dose e da especiação. Muitos metais são essenciais para o crescimento de todos os tipos de organismos, mas quando essenciais estes são requeridos em

baixíssimas concentrações e podem muitas vezes causar efeitos deletérios sobre a saúde quando presentes acima das concentrações essenciais.

O potencial tóxico dos metais pesados ao organismo humano é diverso e está resumido na Tabela 1, que mostra as principais fontes poluidoras e os efeitos na saúde do homem. Devido aeste potencial de toxicidade e persistência na natureza, os níveis aceitáveis de metais pesados são controlados em efluentes, obrigando as fontes produtoras a tratar seus resíduos, o que ajuda na perspectivas de desenvolvimento de novas tecnologias de tratamento.

Tabela 1 - Íons de metais pesados, efeitos na saúde dos seres humanos, principais fontes poluidoras e nível máximo aceitável para potabilidade dos corpos d'água.

| Íon | Efeitos no homem | Principais fontes poluidoras | Potabilidade |
|----------|---|--|--------------|
| Chumbo | Saturnismo, Tontura, Irritabilidade, Dor de cabeça, Perda de memória, Deficiências musculares, Inflamação gastrointestinal, Vômitos e Diarréias | Efluentes industriais, Tabaco, Tintas, Tubulações, Metalurgia e Industria de Eletrodeposição | 0,01mg/L |
| Cádmio | Anemia, Retardamento do crescimento, Morte (9g), Disfunção renal, Hipertensão, Arteriosclerose, Câncer e Doenças crônicas | Efluentes industriais, Galvanoplastia, Produção de pigmentos, Equipamentos eletrônicos, Lubrificantes, Acessórios fotográficos, Inseticidas e Combustíveis fósseis | 0,005mg/L |
| Cromo | Alergias, Câncer e Intoxicação | Efluentes industriais, Produção de alumínio e aço, Tintas, Pigmentos, Explosivos, Papel e Fotografia | 0,05mg/L |
| Mercúrio | Morte (3-30g), Vômitos, Dores abdominais, Diarréia, Osteoporose, Lesões cerebrais e renais, Alterações psicológicas e psicomotoras | Pescados, Garimpos, Praguicidas, Produção de cloro, Desinfetantes, Pigmentos, Mineração, Esgotos, Tintas, Produtos odontológicos e Farmaceuticos | 0,001mg/L |

Fontes: ICSCs (2011), Ministério da Saúde - Portaria nº 518 (2004); NONAMA - Resolução nº 357

Os metais são classificados geralmente em elementos essenciais, microcontaminantes ambientais, elementos tóxicos e elementos radioativos segundo motra a tabela 2 a seguir.

Tabela 2 - Classificação dos Metais

| Metais | Elementos Essenciais | Microcontaminantes Ambientais | Elementos Tóxicos | Radioativos |
|-------------------|---------------------------------|--|------------------------------|--------------------|
| Magnésio | X | | | |
| Sódio | X | | | |
| Potássio | X | | | |
| Cálcio | X | | | |
| Ferro | X | X | | |
| Zinco | X | X | | |
| Cobre | X | | X | |
| Níquel | X | X | X | |
| Arsênio | | X | | |
| Chumbo | | X | X | |
| Cádmio | | X | X | |
| Mercúrio | | X | | |
| Alumínio | | X | | |
| Titânio | | X | | |
| Estanho | | X | | |
| Tungstênio | | X | | |
| Cromo | X | X | | |
| Cobalto | X | X | X | |
| Manganês | X | X | | |
| Mercúrio | | | | |
| Urânio | | | | X |
| Tório | | | | X |
| Césio | | | | X |
| Polônio | | | | X |
| Radio | | | | X |

Os metais pesados constituem a maior fonte poluidora inorgânica de solos e águas (SHOAIB et al., 2012).

Apesar da toxicidade de cada metal variar de acordo com a espécie, geralmente esses efeitos são difíceis de serem distinguidos e perdem em especificidade, pois podem ser provocados por outras substâncias tóxicas ou por interações entre esses agentes químicos. A manifestação dos efeitos tóxicos está associada à dose e pode distribuir-se por todo o

organismo, afetando vários órgãos, alterando os processos bioquímicos, organelas e membranas celulares. Acredita-se que pessoas idosas e crianças sejam as mais susceptíveis a intoxicações por metais pesados sendo as principais fontes de exposição aos metais tóxicos os alimentos, apresentando alto índice de absorção pelo trato gastrointestinal.

Segundo Hu (2014) a escala de classificação de metais no ambiente quanto à gravidade de risco ecológico é Hg > Cd > Pb > Cu > Cr > As > Zn.

Muitos países tem diretrizes regulatórias para a presença e exposição aos metais pesados bem como algumas opções de remediação a um baixo custo e de forma *eco-friendly* (JOSHI et al., 2011).

A portaria nº 518 (BRASIL, 2004) e a resolução no 357 (CONAMA, 2005) dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos níveis de metais pesados em corpos d'água superficiais, bem como estabelece as condições e padrões de potabilidade, devido à sua toxicidade e persistência na natureza.

2.2.1 Chumbo

O chumbo (Pb) é um metal cinza-azulado, de peso atômico 207,19u; baixo ponto de fusão (327,507 °C) e de ebulição (1717 °C) (SILVA, 2001).

O uso diversificado e excessivo deste metal é atribuído, principalmente a maleabilidade e resistência à corrosão. O chumbo é um dos metais mais utilizados na indústria, apenas sendo ultrapassado por outros metais como o ferro, o cobre, o zinco e o alumínio. A principal aplicação do chumbo é na forma de óxido (PbO) na produção de baterias elétricas para veículos automotivos. O consumo de Pb nos países industrializados diminuiu muito nos últimos anos, e a indústria tem buscado substituir este metal devido principalmente ao seu potencial contaminante ambiental. O sistema nervoso, a medula óssea e os rins são considerados órgãos críticos para a intoxicação por chumbo, uma vez que esse interfere nos processos genéticos ou cromossômicos e produz alterações na estabilidade da cromatina, inibindo reparo de DNA e agindo como promotor do câncer.

O chumbo é um elemento tóxico não essencial que se acumula no organismo. Dentre vários metais pesados com potencial poluente, o chumbo está presente na água proveniente de descargas de efluentes industriais, como os efluentes das indústrias de baterias, bem como pelo uso indevido de tintas e tubulações de acessórios à base de chumbo (FATMA, 1999). O chumbo e seus compostos também são utilizados em metalurgia (FATMA, 1999). Assim, o conhecimento sobre substâncias poluentes é necessário, pois os

níveis de toxicidade de uma substância em um determinado ambiente aquático variam. Em humanos a intoxicação por chumbo é associada à esterilidade, aborto, mortalidade neonatal, reações neurotóxicas, deficiências motoras, entre outras (JUBERG et al., 1997). Chumbo é um dos principais metais pesados despejados no ambiente. O consumo destas águas contaminadas afetam fígado, rins, cérebro e sistema nervoso central causando danos cerebrais irreversíveis, distúrbios nervosos e fraqueza dos músculos. O chumbo tem a capacidade de bioacumulação, tanto no sangue e ossos e a sua meia-vida no sangue é de cerca de 30 dias, mas pode permanecer no sistema esquelético durante anos e, por essa razão, a toxicidade do chumbo é um problema persistente.

2.2.2 Cádmio

O cádmio é um elemento traço considerado como metal pesado e está disperso em ambientes naturais e agrícolas, principalmente através de atividades antrópicas como mineração, incineradoras de resíduos urbanos e fontes de combustão de combustíveis fósseis, além de ser amplamente utilizado para revestimento de materiais, em pigmentos de tintas e na indústria plástica (RIVERA-BACERRIL et al., 2002). A principal causa da toxicidade do cádmio é devido a sua combinação com grupos tiólicos (-SH) de enzimas e proteínas. O cádmio em alguns organismos substitui o zinco em diversas metaloenzimas alterando sua atividade, promove a expansão de camadas de fosfolipídios e desacopla a fosforilação oxidativa, gera distúrbios respiratórios, altera a permeabilidade das membranas celulares, entre outros efeitos (MACEDO; MORRIL, 2008).

O Cádmio é muito usado para aplicações como proteção contra corrosão e estabilizante plástico. O Cádmio é carcinogênico, embriotóxico, teratogênico e mutagênico e pode causar hiperglicemia, redução de imunocompetência e anemia, além de interferir no metabolismo do ferro (LEBRUN et al., 1994).

O cádmio é identificado como um metal azul-branco maleável, macio e brilhante ou um pó branco acinzentado que é insolúvel em água e reage prontamente com ácido nítrico diluído. O cádmio pode vir de várias fontes industriais, tais como galvanização, fertilizantes, processamento mineral e fabricação de baterias. As águas residuárias das indústrias têm efeitos tóxicos permanentes em organismos vivos e constitui uma ameaça para o meio ambiente. Contaminação de seres humanos por cádmio foi relatada pela primeira vez no Japão em 1950 onde as lamas de esgoto municipal foi utilizada como um fertilizante para o cultivo do arroz. A exposição ao cádmio pode resultar em efeitos adversos, tais como cancro,

insuficiência pulmonar, disfunção renal (síndrome de Fanconi), distúrbios de degradação óssea, no sistema cardiovascular, fígado e danos do rim.

O cádmio geralmente ocorre em baixas concentrações no ecossistema, mas pode ser encontrado em altas concentrações quando em associação com o minério de zinco. A dispersão no meio ambiente ocorre a partir de várias fontes, incluindo inadequada eliminação de resíduos eletrônicos e de produção industrial. A dieta alimentar dos seres humanos é a principal fonte de exposição ao cádmio ambiental em não-fumantes na maioria das regiões do mundo. O cádmio está presente em quase todos os alimentos, mas as concentrações variam dependendo do tipo de alimento e o nível de contaminação ambiental. Alimentos de origem vegetal geralmente contém maiores concentrações de cádmio do alimentos de origem animal tais como carne, ovos, produtos derivados do leite e peixes. Fumar é outra fonte importante fonte de exposição ao cádmio. Um cigarro pode conter de 1 a 2 g de cádmio, mas este varia de acordo com a marca. Estima-se que uma pessoa fuma 20 cigarros por dia irá absorver cerca de 1 g por dia de cádmio. Estudos recentes com base na dose semanal tolerável sugerem que níveis seguros de ingestão para um adulto é de 30 g / dia . O cádmio pode bioacumular seres humanos e tem uma meia-vida longa nos tecidos de 10 a 30 anos , em particular nos rins. Em áreas de alta exposição , tais como Toyama, Japão, a intoxicação crônica da população a partir de um rio contaminado conduziu ao aparecimento do que tem sido chamado Itai – doença itai. Esta doença é caracterizada por um amolecimento dos ossos, resultando em dor nas articulações e insuficiência dos rins e outras complicações.

2.2.3 Cromo

O cromo é um elemento biorreativo que, embora presente no organismo em pequenas quantidades (elemento traço) realiza importantes funções, particularmente no metabolismo da glicose. No entanto, quando em concentrações elevadas e, sobretudo em estado de oxidação diferente de III, é potencialmente perigoso à saúde e ao equilíbrio ambiental (NRIAGU; NIEBOER, 1988). Seu uso mais comum e suas principais fontes no meio ambiente são a mineração e as indústrias de cromagem e de curtimento de couro para confecção de bens de consumo. Ressalte-se que a legislação brasileira impõe uma série de regras rigorosas aos projetos industriais que utilizam esse elemento (NRIAGU, 1992).

Entre os vários metais pesados , o cromo é um dos contaminantes mais tóxicos gerados pela a fabricação de galvanização , curtimento de couro , acabamento metálico , aço, indústrias têxteis , produção de energia nuclear, preservação da madeira, anodização do

alumínio. A forma de cromo hexavalente, geralmente presente na forma de cromato (CrO_4^{2-}) e dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), possui níveis significativamente mais elevados de toxicidade do que outros estados de valência. Embora exista cromo em nove estados de valência que variam de -2 a +6, Cr (III) e Cr (IV) são de grande relevância ambiental devido a sua alta solubilidade em água e mobilidade (CHEN, 2010; COMBER; GARDNE, 2003; WANG; CHEN, 2009). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) de água potável, os limites máximos admissíveis para o cromo hexavalente e cromo total são 0,05 e 2mg/L, respectivamente.

A toxicidade de Cr (VI) origina a partir da sua propriedade de oxidação e formação de radicais livres no interior da célula durante a redução de Cr (VI) a Cr (III) (PREUSS et al., 2008; SADEGHI; MOGHADDAM, 2012). Portanto, os métodos de remoção seletiva de Cr (VI) na presença de Cr (III) é de grande importância.

Especialmente nos efluentes das indústrias de curtume, a contaminação dos efluentes por cromo é uma das principais causas de poluição ambiental. O cromo é usado no curtimento de couros e peles resultando em descarga de cromo nestes efluentes, causando graves problemas ambientais assim como mostra a figura 1.

Figura 1 - Efluente contaminado por cromo de origem industrial



Fonte, SILVA, 2010.

Toxicidade do cromo tem efeitos deletérios in vivo devido ao potencial carcinogênico, mutagênico e teratogênico, além de frequentemente resultar em danos nos tecidos (DHANKHAR; HOODA, 2011). Os limites permitidos de cromo total em efluentes de curtume é entre 1 e 2 mg/L de acordo com EUA, Reino Unido e Índia Standards (BULJAN, 1996).

O cromo tem sido utilizado industrialmente por mais de um século e poder ser detectado em concentrações que variam de menos de $0,1 \text{ g} / \text{m}^3$ no ar até $4 \text{ g} / \text{kg}$ em solos. Estudos em cobaias mostraram que a microbiota intestinal, detoxifica o cromo através da conversão do cromo mais tóxico $\text{Cr}(\text{VI})$ a uma forma menos tóxica $\text{Cr}(\text{III})$.

2.2.4 Mercúrio

O mercúrio é, dentre os metais contaminantes, aquele que apresenta o maior potencial de toxicidade. Principalmente por apresentar uma forma química estável na atmosfera como sua forma volátil, o vapor de mercúrio (Hg^0) pode ser transportado em escala global, afetando áreas naturais remotas longe de fontes pontuais de contaminação (BARKAY et al., 2003; DOREA et al., 2003) o que se torna um grande problema no controle da poluição e contaminação. A poluição das águas por mercúrio está associada especialmente à possibilidade de metilação no meio ambiente de sua forma inorgânica Hg^{2+} por microrganismos e à complexação com compostos orgânicos dissolvidos que possibilita a manutenção de concentrações relativamente elevadas na coluna d'água e acesso preferencial a esta biota. O metilmercúrio é lipossolúvel e por isso é muito bem absorvido pelas membranas biológicas em geral, assim como pelos tratos digestivos de praticamente todos os organismos das cadeias alimentares. Esses processos facilitam a permanência e o transporte de mercúrio no meio aquático, assim como transferem a contaminação para um ecossistemas bastante afastados da fonte de contaminação (FRANKLIN, 2010). Assim, a organificação do mercúrio acelera a bioacumulação na cadeia alimentar e maximiza seus efeitos sobre riscos em ecossistemas naturais e a saúde humana (PORCELLA, 1994; NRIAGU, 1992).

É encontrado em estado líquido à temperatura ambiente mas facilmente se evapora no vapor Hg , que é incolor e inodoro. Hg^{2+} é o estado de oxidação de Hg e ocorre naturalmente no meio ambiente sob a forma de sais catiónicos divalentes de Hg , tais como sulfureto mercúrico (HgS), cloreto de mercúrio (HgCl_2) e outros compostos. Ele também pode ser encontrado em certos cremes de clareamento da pele, medicamentos homeopáticos e baterias. Dos muitos compostos orgânicos de Hg , tais como MeHg , etil- Hg e fenil- Hg , MeHg é o mais comum no ambiente, porque ele está exposto para a população humana através o consumo de peixe e arroz, principalmente no interior da China.

O mercúrio é, dentre os metais contaminantes, aquele que apresenta a maior toxicidade. Por apresentar uma forma química estável na atmosfera como sua forma volátil, o vapor de mercúrio (Hg^0) pode ser transportado em escala global, afetando áreas remotas

naturais longe de fontes pontuais de contaminação (BARKAY et al., 2003; DOREA et al., 2003). A poluição das águas por mercúrio está associada especialmente à possibilidade de metilação no meio ambiente de sua forma inorgânica Hg^{2+} por microrganismos e à complexação com compostos orgânicos dissolvidos que possibilita a manutenção de concentrações relativamente elevadas na coluna d'água e acesso preferencial a esta biota.

A Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças classificou o mercúrio como substância perigosa de terceira prioridade ficando atrás apenas do metal arsênio e do chumbo. A sua presença na atmosfera deriva de atividades naturais e antrópicas (SELIN, 2009) e é capaz de ser retido por 6-24 meses.

As faixas de emissões globais de mercúrio recentemente estimadas a partir de 5500 a 8900 toneladas de mercúrio. As atividades antropogênicas emitem 1960 toneladas de mercúrio para a atmosfera, principalmente da queima de carvão (85%), mineração e fundição contribuem com (10%), a produção de cimento (9%), mineração artesanal e de ouro em pequena escala (37%). Os contribuintes menores são a queima de petróleo e gás natural, produção primária de metais ferrosos, produção de ouro em grande escala, extração de mercúrio, refino de petróleo, indústria de cloro e álcalis, resíduos e produtos de consumo, amálgama dental.

Ambientes aquáticos são importantes na via e destino do mercúrio. O mercúrio inorgânico dissolvido ou em forma de partículas é o tipo dominante no ambiente marinho e de água doce. Mercúrio total em água pode conter mercúrio elementar gasoso dissolvido (inferior a 30%) e metil-mercúrio em níveis residuais, que podem chegar a 30% do total de mercúrio. A transformação de mercúrio inorgânico para metilmercúrio ocorre principalmente em sedimento.

Contaminação por mercúrio em solos agrícolas é geralmente devido ao uso de águas residuais municipais e efluente industriais para irrigação, o que muitas vezes ocorre em países em desenvolvimento (THIPPESWAMY et al., 2012).

As outras fontes de mercúrio nos campos da agricultura também vêm de fertilizantes e pesticidas, fungicidas, embora a utilização de mercúrio nesses produtos tem sido muito controlada e reduzida.

Depois de entrar no ambiente, Hg sofre uma série de processos de transporte e transformação. O ciclo biogeoquímico de Hg determina as formas químicas de Hg presente em diferentes partes do ambiente (MONACHESE et al., 2012). Gasoso Hg^0 compõe aproximadamente 95% do Hg atmosférico, além de pequenas quantidades de partículas Hg^{2+} e Hg gasoso reativo. Hg^0 é muito estável e pode circular na atmosfera entre 6 meses e 2

anos. Na sua forma gasosa pode ser transportado através de longas distâncias e dispersos em uma escala global. Como Hg^{2+} é aproximadamente 105 vezes mais solúvel em água do que Hg^0 , ele pode mais facilmente ser depositado a partir do ar (BLUMER, 2002).

Hg é liberado para a água por processos industriais, processamento de esgoto ou deposição atmosférica. Quando Hg entra na água, que pode ser absorvido pelas partículas inorgânicas, partículas biológicas ou matéria orgânica (SINHA et al., 2013).

2.3 Biorremediação

Técnicas atualmente existentes para a remoção dos metais pesados a partir de águas contaminadas incluem: osmose inversa, eletrodialise, ultrafiltração, precipitação química de troca iônica, fitoremediação, etc. No entanto, todos estes métodos têm desvantagens, como remoção incompleta de metal, altas exigências de reagentes e de energia, geração de lama tóxica ou outros resíduos de produtos que solicitar a eliminação cuidadosa (AHALYA et al., 2003; PETERS et al., 1985), no entanto são muito caros e não removem o contaminante até os limites desejados, por essa razão, microrganismos têm sido relatados como eficientes adsorventes biológicos para remover metais pesados de locais contaminados (BAE; ABRAHIM, 2003; VEGLIO; BEOLCMI, 1997).

Com aumento da consciência ambiental e restrições legais sendo impostas à descarga de efluentes, a necessidade de tecnologias alternativas de baixo custo são essenciais. Assim sendo, a biomassa microbiana tem emergido como um opção para o desenvolvimento de processo de tratamento de águaeco-friendly.

A contaminação dos ambientes aquáticos por metais pesados necessita de soluções alternativas como a biorremediação, por exemplo, que não geram poluições secundárias como consequência e o uso de fungos filamentosos e leveduras como agentes biorremediadores da contaminação de solos e água vêm sendo bastante estudado (HÖLKER et al., 1995), pois a capacidade de adsorção dos fungos aplica-se a metais pesados (PEINTNER; MOSER, 1996), defensivos agrícolas (PAOLETTI, 1999), entre outros.

Biorremediação é um processo envolvendo microrganismos que são capazes de remover ou reduzir poluentes no ambiente, sendo uma alternativa ecologicamente adequada, visto que o impacto ambiental causado por esses tipos de remediação são menores (GADD et al., 2004). O uso de fungos filamentosos e leveduras como agentes biorremediadores da contaminação de solos e água vêm sendo bastante estudado (HÖLKER et al., 1995), pois a

capacidade de adsorção dos fungos aplica-se a metais pesados (PEINTNER; MOSER, 1996), defensivos agrícolas (PAOLETTI, 1999), entre outros.

O acúmulo de metais na superfície celular chama-se bioissorção, no entanto, se tal acúmulo depende da atividade metabólica do microrganismo, então passa a ser chamada de bioacumulação (BLUMER, 2002). Porém, quando os metais se acumulam no interior da célula, os íons metálicos podem se localizar em organelas, ou ligar-se a proteínas, deslocando alguns íons de suas posições habituais, prejudicando assim, as funções metabólicas (GADD, 1993).

Os metais adsorvidos podem ser removidos por processo chamado de dessorção e o bioissorvente pode ser reutilizado para a tratamentos adicionais (EPA, 2005).

A biorremediação faz uso de organismos vivos (normalmente bactérias ou fungos) para promover a degradação de poluentes. Uma variante da biorremediação é a fitoremediação, onde são usadas plantas. A biorremediação permite a descontaminação *in-situ*, ou seja, no próprio local contaminado, minimizando os custos de remoção e posterior tratamento do local contaminado. Por outro lado, o tempo necessário para se atingir uma determinada degradação dos poluentes (90%, por exemplo) é normalmente superior à que seria alcançada em um reator próprio, onde o inóculo (os microrganismos que se pretende fazer reproduzir) está sujeito às condições ideais para o seu crescimento. O objetivo da biorremediação é mineralizar os poluentes, libertando apenas substâncias inertes como o dióxido de carbono (ainda que seja um gás de estufa, mas a contribuição da biorremediação é insignificante para este efeito) e a água (QUINA, 2002). Como metais pesados não podem ser mineralizados, essa técnica não pode ser aplicada a metais pesados.

Alguns fungos, como os do gênero *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichodermae* ainda, leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhodotorula spp.* são capazes de remover metais pesados do ambiente, pois possuem maior resistência a metais tóxicos, o que proporciona o seu desenvolvimento em meios com altas concentrações destes elementos (BLUMER, 2002).

Bioissorção é um processo que utiliza biomassa morta para sequestrar metais pesados tóxicos e é particularmente útil para a remoção de contaminantes a partir de efluentes industriais (KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1997). O processo de bioissorção usando biomassa microbiana como adsorvente surgiu como uma alternativa potencial para a remoção de metais.

A fim de qualificar-se para aplicações industriais, bioissorventes tem de ser produzidos a um baixo custo. Paredes das células fúngicas e os seus componentes têm papel importante

na biossorção (GADD, 1996; HAFEZ et al., 1997; KAPOOR, 1997; KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1995).

Microrganismos podem acumular metais por diversos mecanismos tais como captação por transporte através de membrana, biossorção na parede celular, aprisionamento em cápsulas extracelulares, precipitação e reações de oxidação-redução. Composição da parede celular é um dos fatores mais importantes que afetam as propriedades biossorbentes dos microrganismos.

2.4 Fungos (leveduras e filamentosos)

A utilização de microrganismos para a acumulação de metais pesados foi relatada pela primeira vez no início de 1980. A parede da célula é o primeiro componente que entra em contato com os íons metálicos. A parede celular oferece um número de sítios ativos capazes de fazerem ligação com íons metálicos. As diferenças na composição da parede celular entre diferentes biossorbentes podem causar variação significativa no tipo e quantidade de íons de metal se ligar a elas. Conforme a dependência do metabolismo da célula, mecanismo de biossorção pode ser dividido em metabolismo-dependente e processos independentes de metabolismo. Com base no local em que o metal removido da solução é encontrada, os processos de biossorção podem ser classificados como:

- sorção da superfície celular
- acumulação intracelular
- acúmulo por precipitação/extracelular

A sorção de íons metálicos na superfície celular ocorre pela interação físico-química entre o metal e os grupos funcionais presentes na superfície da célula do fungo.

Microrganismos resistentes aos metais pesados podem frequentemente estar presentes em locais contaminados por metais pesados. A resistência e a eficiência de microrganismos na remoção destes metais variam muito. Portanto, o isolamento de fungos a partir de locais contaminados por metais pesados nos fornece um indicativo (JOSHI et al., 2011). Além disso, alguns microrganismos defendem-se da presença de íons de metais pesados através da síntese de peptídeos ricos em cisteína, tais como a glutatona (GSH), fitoquelatinas (PCs) ou de metalotioneínas (MTs). Esses peptídeos se ligam aos íons metálicos, retendo-os em sua

superfície celular (MEJÀRE; BÜLOW, 2001; RAUSER, 1995). Vários são os peptídeos com esta capacidade de retenção (KOTRBA et al., 1999).

2.5 Melhoramento Genético (gene EC20)

A levedura *S. cerevisiae* é um fungo unicelular ascomiceto, que pode alternar seu ciclo de vida com fase sexuada e assexuada. Os conhecimentos sobre a genética, fisiologia e a biologia molecular de *S. cerevisiae* estão hoje mais avançados do que para qualquer outro eucarioto, podendo as células ser manipuladas quase tão facilmente quanto a bactéria *Escherichia coli*, além disso, foi o primeiro eucarioto a ter seu genoma completamente sequenciado.

Um dos mecanismos de tolerância a metais pesados está relacionado com a síntese de peptídeos tiólicos chamados fitoquelatinas presentes em plantas, fungos e algas (GIETZ; SUGINO, 1989; MARTIN; GRISWOLD, 2009; RAUSER, 1995). Esses peptídeos são sintetizados enzimaticamente, usando glutationa (GSH) como substrato, através de uma reação catalizada pela enzima fitoquelatina sintase, que é ativada pela presença de metais pesados.

De acordo com Yan e Viraraghavan (2000), o metal Cádmio é o mais forte indutor de fitoquelatinas in vivo, no entanto, a síntese não está relacionada somente a esse elemento. Grill e colaboradores (1987) estudando a síntese de fitoquelatinas em uma suspensão de cultura de células de *Rauvolfia serpentina* exposta a metais pesados, conclui que no caso de plantas, os metais induzem a síntese de fitoquelatinas na seguinte ordem decrescente: Cd²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺, Sb³⁺, Hg²⁺, As⁵⁻, Cu⁺, Sn²⁺, Au³⁺+Bi³⁺.

Os microrganismos, em geral, defendem-se da presença de íons de metais pesados através da síntese de peptídeos ricos em cisteína, tais como a glutationa (GSH), fitoquelatinas (PCs) ou de metalotioneínas (MTs). Esses peptídeos se ligam aos íons metálicos, retendo-os em sua superfície celular (MEJÀRE; BÜLOW, 2001; RAUSER, 1995). Vários são os peptídeos com esta capacidade de retenção (KOTRBA et al., 1999). Uma classe de peptídeos que adsorvem diversos íons de metais foi proposta por Bae e colaboradores (2000), cuja estratégia foi obter uma proteína análoga à fitoquelatina natural, que denominaram de fitoquelatinas sintéticas (ECs). As fitoquelatinas são peptídeos curtos, que contem uma estrutura química consistindo de unidades Glu-Cys repetitivas. As fitoquelatinas apresentam vantagens sobre as metalotioneínas em razão de suas características estruturais. As fitoquelatinas são mais estáveis e têm maior capacidade de ligação aos metais. Além disso,

podem incorporar altos níveis de sulfeto inorgânico, o que resulta num forte aumento da sua capacidade de ligação aos íons Cd^{2+} (BAE et al., 2003). Porém, ainda não foi possível a produção de fitoquelatinas por engenharia genética por falta de conhecimento suficiente sobre as enzimas envolvidas em sua síntese. Os análogos de fitoquelatinas sintetizados apresentam uma ligação peptídica entre Glu e Cys, de tal modo que esses análogos, chamados de ECs podem ser produzidos pela maquinaria ribossomal da célula. Além disso, EC de diferentes comprimentos de cadeia podem ser produzidos, apresentando diferentes capacidades de ligação aos metais. Bae e colaboradores (2000) clonaram em *E. coli* genes sintéticos que codificam EC. Esses autores construíram fusões entre EC de diferentes comprimentos em uma proteína de superfície de *E. coli*, tendo verificado que uma cadeia de apenas 20 unidades poliméricas de EC apresenta uma capacidade de ligação aos íons Cd^{2+} 40% maior que as metalotioneínas de mamíferos (BAE et al., 2002).

Assim, o intuito desse trabalho foi selecionar fungos isolados a partir de ambientes aquáticos contaminados por íons de metais pesados que conseguissem acumular altas concentrações destes íons (Pb, Cd, Cr e Hg) em sua superfície celular se mostrando como potenciais microrganismos biorremediadores, além de um esforço no sentido de transformar uma cepa controle de *Saccharomyces cerevisiae* com o gene sintético análogo às fitoquelatinas naturais, o EC20 afim de que tal levedura se tornasse mais eficiente no processo de retenção dos metais pesados.

3 OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi isolar de ambientes aquáticos e identificar espécies de fungos tolerantes a metais pesados com capacidade de concentração destes compostos em sua superfície celular e a inserção de genes exógenos ao DNA de fungo, que confere uma maior capacidade de absorção de metais pesados em sua superfície celular.

3.1 Objetivos específicos

Isolar e identificar fungos em amostras de água do Rio Tietê e Represa Billings de diferentes pontos de coleta;

Identificar morfológicamente e molecularmente as espécies fúngicas;

Selecionar os fungos quanto a sua capacidade de crescimento frente aos íons de metais pesados (Chumbo, Cromo, Cádmio e Mercúrio);

Determinar a velocidade de crescimento radial frente aos íons de metais pesados;

Avaliar a distribuição dos metais pesados na célula fúngica;

Construir vetores de expressão para expressar o gene *EC20* análogo à fitoquelatina nos fungos controle *Saccharomyces cerevisiae*;

Realizar transformação fúngica de *S.cerevisiae*, inserindo genes exógenos em vetores de clonagem e de expressão com o intuito de melhorar a capacidade de remoção dos íons de metais pesados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

Amostras de água (500 mL) e sedimento (500g) foram coletadas a partir de diferentes pontos em ecossistemas aquáticos (Rio Tietê e Rio Pinheiros) situados na região metropolitana do estado de São Paulo. Os pontos de coleta foram selecionados juntamente com os técnicos da CETESB a partir de estudos prévios, levando-se em conta os locais (Tabela 1) de maior ocorrência de contaminação por íons de metais pesados (no sedimento e na coluna d'água) de acordo com relatórios produzidos pela CETESB nos últimos anos (CETESB, 2013). Na figura abaixo (figura 2) está representada a localização simplificada dos locais onde foram coletadas as amostras de água e sedimento (Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos 6 e 10). As amostras foram retiradas de cada local pelos técnicos da CETESB, utilizando as devidas técnicas de coleta e amostragem para água e sedimento e acondicionadas em frascos estéreis, transportadas sob refrigeração para o laboratório, armazenadas e processadas em até 24 horas após as coletas. Foram amostradas e analisadas amostras de água em pontos estrategicamente determinados (figuras 3a e 3b). Estes pontos de amostragem se localizam na região metropolitana de São Paulo ou próximos a esta. As amostragens foram realizadas a cada 2 meses, obedecendo a rotina de amostragem e análise da CETESB para os pontos escolhidos - análise bimestral de amostras da coluna d'água (10 pontos amostrados) e análise anual do sedimento (4 pontos amostrados) totalizando 64 amostras ao longo do ano de 2013.

Figura 2- Classificação das UGRHI's (Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos)



Mapa do Estado de São Paulo apresentando a localização das UGRHI's (Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos).

Figura 3 - Coleta de amostras (a) Coleta de Sedimento; (b) coleta de água; (c) acondicionamento das amostras



Figura 4 - Mapa da UGRHIs 6

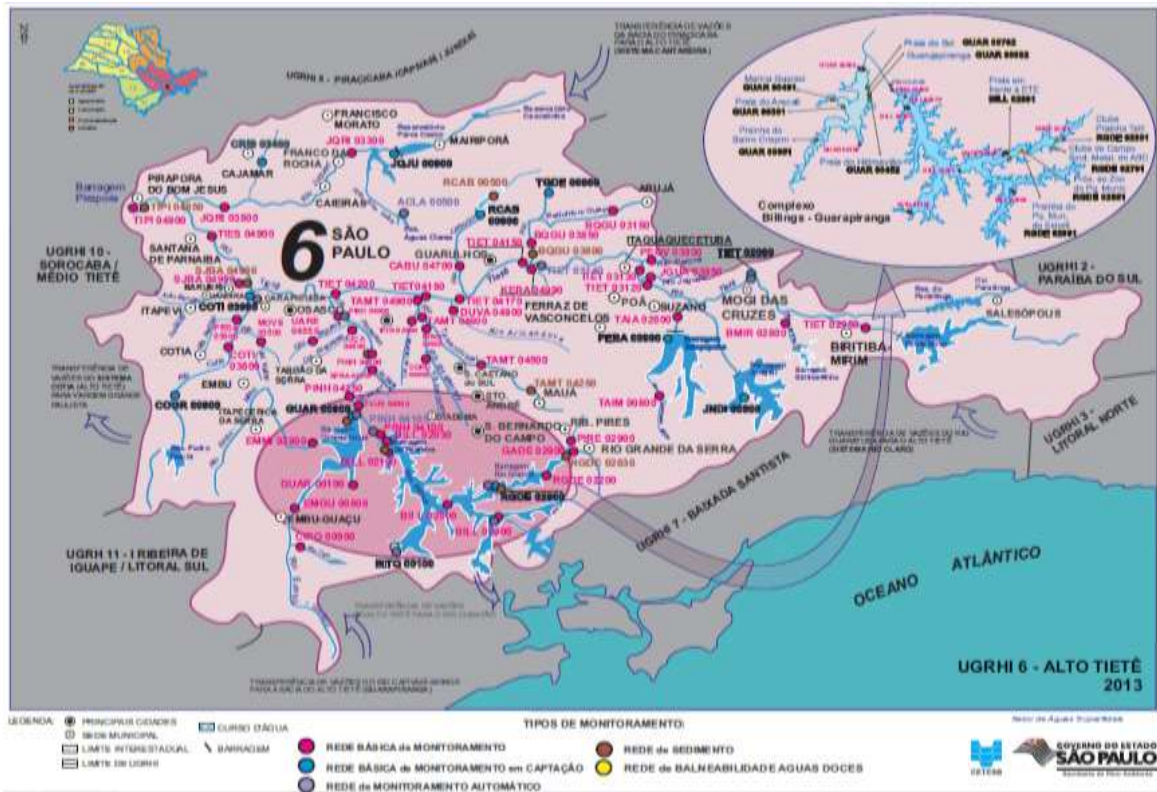


Figura 5 - Mapa da UGRHI 10

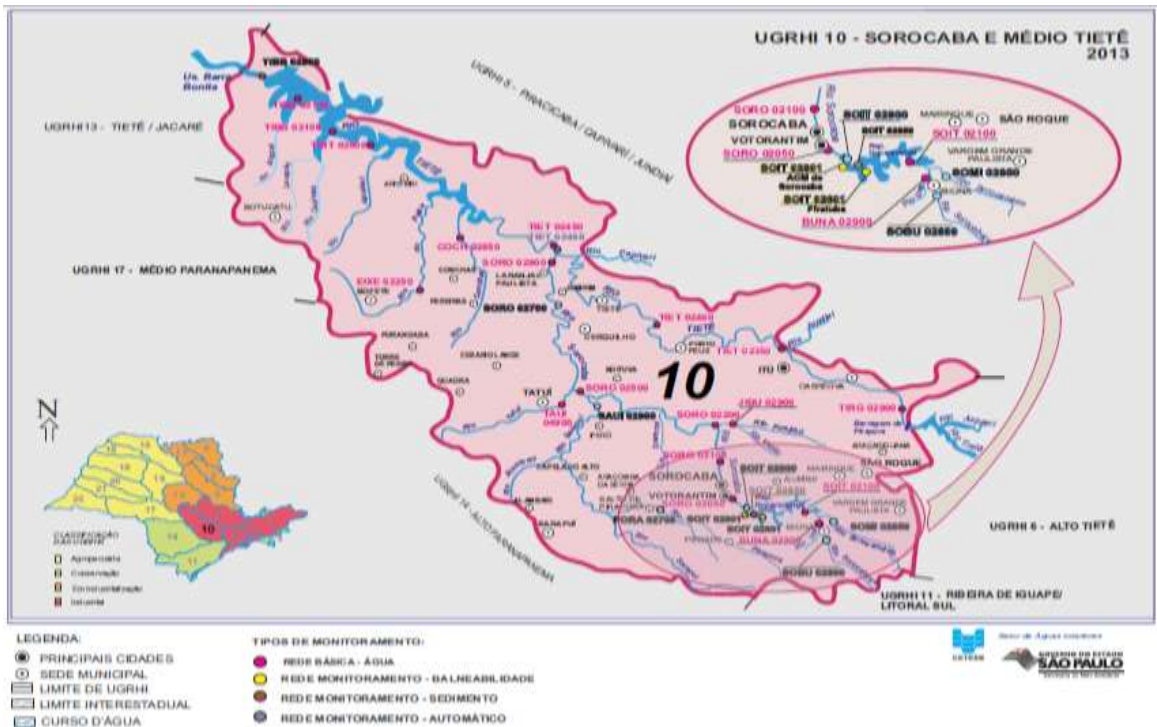


Tabela 3- Pontos de Coleta de água e sedimento durante o período de um ano.

| Pontos de Coleta | Tipo de Amostra | Local de Amostragem | LAT. S / Long. W | UGRHI's |
|------------------|-----------------|--|---------------------|---------|
| BILL 02100 | Água | Represa Billings - No meio do corpo central, na direção do braço do Bororé. S. Bernardo do Campo. | 23 45 16 / 46 38 40 | 06 |
| BILL 02100 | Sedimento | | 23 47 11 / 46 38 49 | |
| BILL 02500 | Água | Represa Billings - No meio do corpo, sob a ponte da rodovia dos Imigrantes. S. Bernardo do Campo. | 23 47 27 / 46 35 54 | |
| RGDE 02900 | Água | Represa do Rio Grande - Próximo à Rodovia Anchieta, junto a captação da SABESP. S. Bernardo do Campo. | 23 46 07 / 46 32 00 | |
| RGDE 02900 | Sedimento | Represa do Rio Grande - No corpo central, à 2 Km da barragem, em frente ao Clube do BANESPA. S. Bernardo do Campo | 23 46 40 / 46 30 42 | |
| RGDE 02200 | Água | Represa do Rio Grande - No Clube Prainha Tahiti Camping Náutica, na altura do Km 42 da Rodovia SP-31. Ribeirão Pires. | 23 44 23 / 46 26 44 | |
| TIET 04150 | Água | Rio Tietê - Ponte na Rod. Ayrton Senna, à montante do Parque Ecológico, antes da saída 19. Aeroporto de Guarulhos. Guarulhos | 23 28 36 / 46 29 55 | |
| TIET 04160 | Sedimento | Rio Tietê - A 800 metros a jusante da Barragem da Penha, embaixo da rede elétrica. Guarulhos. | 23 29 45 / 46 32 08 | |
| NINO 04900 | Água | Ribeirão dos Meninos - Ponte Av. do Estado , na divisa dos municípios de São Paulo e São Caetano do Sul. São Paulo. | 23 36 00 / 46 34 43 | |
| KERA 04990 | Água | Ribeirão Itaquera - Ponte a cerca de 70 metros da sua foz no Rio Tietê. São Paulo | 23 28 50 / 46 26 25 | |
| PINH 04900 | Água | Rio Pinheiros – Próximo à sua foz no Rio Tietê, na Estrutura do Retiro. São Paulo | 23 31 52 / 46 44 54 | |
| TIRG 02900 | Água | Represa de Rasgão – Próximo das comportas do Reservatório de rasgão. Pirapora do Bom Jesus. | 23 22 58 / 47 01 46 | 10 |
| TIBB 02700 | Água | Represa de barra Bonita – No meio do corpo central, na direção do Córrego Araquazinho. São Manuel | 22 32 39 / 48 26 48 | |
| TIBB 02900 | Sedimento | Represa de Barra Bonita – No meio do corpo central, à 300 metros da barragem | 22 31 23 / 48 31 08 | |

4.2 Identificação macromorfológica e micromorfológica

A identificação morfológica dos fungos previamente isolados foi realizada pela inoculação de 10µl de suspensão de conídios no centro de placas de Petri contendo 20 mL de meio de Agar Batata Dextrose (BDA) (DIFCO) e as placas foram mantidas em estufa a 25°C. Durante o crescimento, os fungos foram observados em relação às características de cor, tamanho, textura da colônia e verso-reverso. Os fungos foram também submetidos à técnica de microcultivo (RIDDELL, 1950), para a verificação de suas características microscópicas. Os fungos foram identificados em nível de gênero de acordo com os compêndios de Barron (1972), Arx (1974), e Pitt e Hocking (2009).

4.3 Identificação molecular dos fungos

4.3.1 Extração do DNA

Após identificação macro e micromorfológica prévia, os fungos isolados foram cultivados em meio YES (Extrato de Levedura, Sacarose e Ágar) e mantidos em estufa a 25°C durante cinco dias. Após o período de crescimento, o micélio foi raspado e colocado em microtubos. O micélio foi processado com o kit comercial PrepMan Ultra (Applied Biosystem) para extração do DNA (segundo as recomendações do fabricante). Este foi aquecido em banho-Maria por 15 minutos a 100°C e centrifugado por 7 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi recolhido e transferido para um segundo tubo. O DNA extraído foi quantificado em Nanodrop (Applied BioSystems) em seguida diluído à concentração ideal para a realização da PCR.

4.3.2 Amplificação da região ITS pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25 µl, contendo 10 pmol de cada um dos iniciadores, 1,5 µl de MgCl₂ (25 mM), 1,0 µl de dNTP (5 mM) 2,5 µl de tampão da Taq 10X, 1U de Taq DNA Polimerase e 20 ng de DNA (Fermentas). Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ITS-1 e ITS-4. (ITS1 – TCCGTAGGTGAACCTGCG e ITS 4 – TCCTCCGCTTATTGATAT) (SCHIELTL; GIETZ, 1998). Estes oligonucleotídeos são complementares às regiões do rDNA 18S e 28S e

permitem amplificar parcialmente o rDNA 18S (ANDERSON; CAIRNEY, 2004). O marcador de peso molecular utilizado foi de 1 Kb DNA *ladder* (Invitrogen).

4.3.3 Purificação dos fragmentos amplificados

Os fragmentos gerados pela técnica de PCR utilizando o par de iniciadores ITS1 e ITS4 foram purificados em seguida utilizando o kit para purificação (EXO/SAP - GE Healthcare) seguindo instruções do fabricante. Após a reação da PCR ser confirmada por gel de agarose 1,2%, foram adicionadas às amostras resultantes da PCR, 1mL de exonuclease e shrimp alkaline phosphatase a fim de purificar as amostras. Feito isso, as amostras foram quantificadas utilizando o equipamento Nanodrop (Applied Biosystems).

4.3.4 Sequenciamento da região ITS

A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador *Applied Biosystems Thermocycler GeneAmpR9700*, utilizando 0,8 µL do BigDye Terminator v3.3. (Applied Biosystems), 3µL do tampão para BigDye, 1 µL do iniciador (4 µM), 10 µL de água MilliQ esterilizada e 1 µL de DNA (10 a 20 ng). As condições da reação foram: 95°C (2 minutos), 25 ciclos de 96°C (20 segundos), 55°C (20 segundos) e 60°C (4 minutos). Após a reação, as amostras foram purificadas utilizando 60 µL de isopropanol 100% e 30 µL de água MilliQ, em seguida, incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 14000 rpm (25 minutos), o sobrenadante foi descartado e 150 µL de isopropanol 75% adicionados. O material foi centrifugado novamente a 14000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o tubo seco em *Speed Vacum*. As amostras foram ressuspensas em formamida *Hi-Di* (Applied Biosystems), desnaturadas a 95°C por 2 minutos e incubadas em gelo por 1 minuto. Em seguida foram aplicadas as colunas capilares contendo o polímero POP6 no sequenciador automático *Abi Prism R Genetic Analyser* (Applied Biosystems). As sequências foram editadas utilizando o software BioEdit v7.0.9.0 e posteriormente alinhadas com o Blast dos bancos de dados, GeneBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.4 Determinação da velocidade de crescimento radial frente aos íons de metais pesados

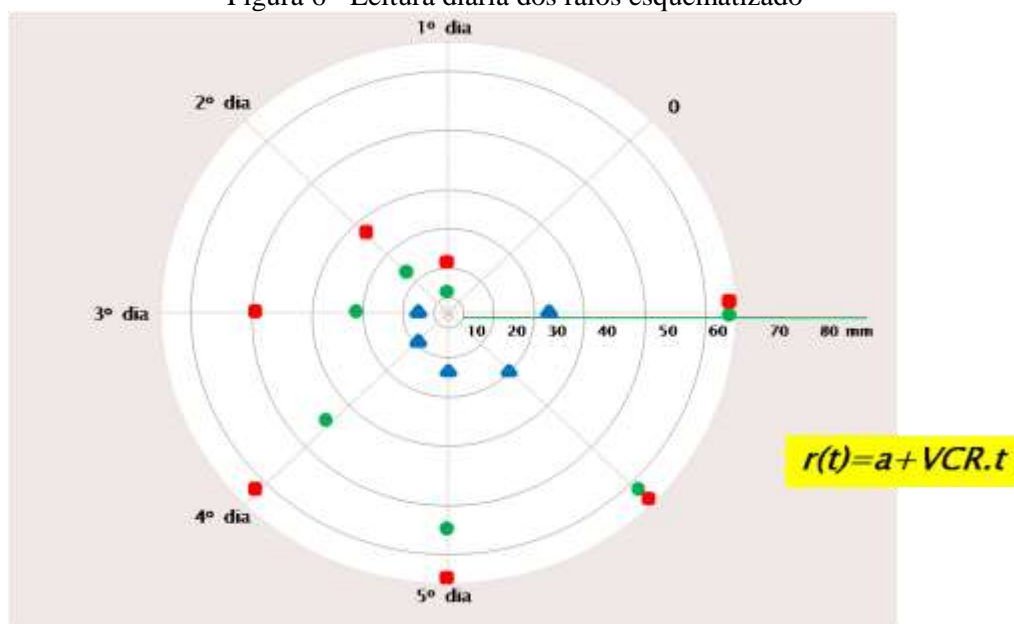
Os microrganismos isolados e identificados na etapa anterior foram testados quanto à sua velocidade de crescimento radial em placa de Petri. A seleção dos microrganismos foi

realizada através de plaqueamento em meio BDA (DIFCO) suplementado com metais pesados ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ / CdCl_2 / $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ / HgCl_2) fazendo-se uma inoculação pontual de conídios no centro da placa de Petri contendo o meio de cultura. Para a obtenção da suspensão de conídios, uma suspensão de conídios foi preparada e contada em câmara de Neubauer e padronizada uma contagem de 1×10^5 ufc/mL. Foi preparada uma suspensão de conídios em ágar 0,1% e realizada a inoculação com um micropipetador, para evitar espalhamento de conídios sobre a superfície. Os cultivos foram mantidos em estufa a 30°C por cinco dias, sendo medido o diâmetro da área recoberta pelo fungo a cada 24 horas. Foram medidos seis raios em cada placa, diariamente de acordo com o protocolo desenvolvido por Colla e colaboradores (2008) com modificações. Os resultados foram plotados em um gráfico e analisados segundo a seguinte equação:

$$r(t) = a + V_{CR} \cdot t$$

Onde $r(t)$ é o raio da colônia (cm), a é a constante da regressão linear, V_{CR} é a velocidade de crescimento radial (cm/dia) e t é o tempo de cultivo (dia). Na figura abaixo (fig. 3), um esquema de como foi realizada a leitura diária dos raios da colônia.

Figura 6 - Leitura diária dos raios esquematizado

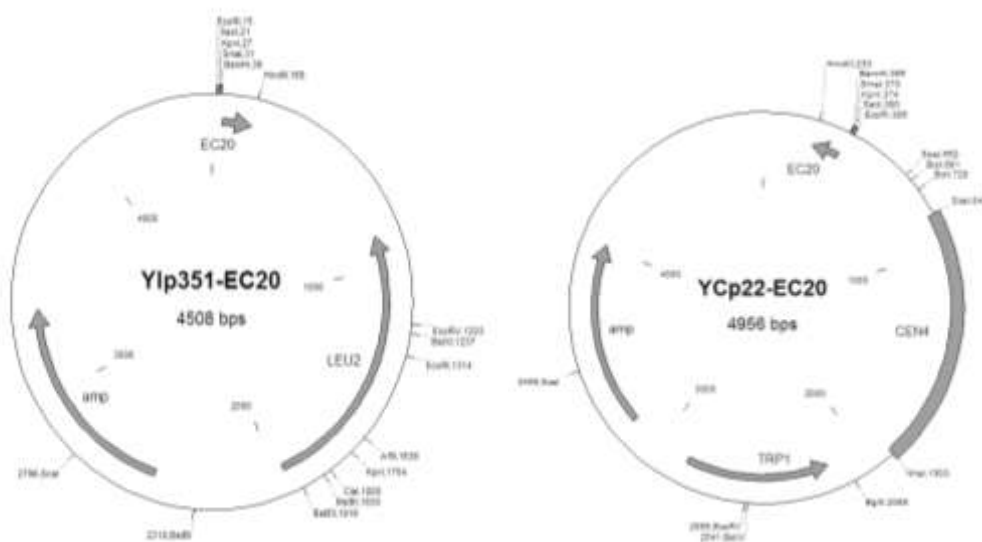


2000rpm. Em seguida, as células foram ressuspendidas em 10mL de CaCl₂, 30mM e deixadas em gelo por 30 minutos. Após esse tempo, foram centrifugadas por 10 minutos, a 4°C a 2000rpm. O pellet foi suspenso em 5mL de CaCl₂ 30mM. As células permanecem competentes por 4 horas.

4.5.4 Transformação de *E.coli* competentes

Após a preparação dos vetores YIp351 e YCp22, 200uL de células competentes foram adicionadas a cada solução contendo o vetor. A mistura de célula e vetor foi mantida em gelo por 10 minutos, submetida ao choque térmico por 2 minutos 42°C, seguida de 30 segundos no gelo. Foi adicionado 1 mL de LB com posterior incubação a 37°C por 30 minutos, e em seguida, centrifugadas por 3 minutos. Após isso, as células foram plaqueadas em LA (Luria Bertani Agar).

Figura 7 - Vetores de transformação (a)YIp351-EC20; (b) YCp22-EC20



4.5.5 Mini-Prep

Da cepa de *E.coli* transformada, foram escolhidas 3 colônias para a extração de plasmídeos contendo os insertos. Em 1mL de solução I (50mM Glucose, 25mM Tris-Cl pH8.0, 10mM EDTA) gelada foi adicionado 5 mg de lizozima e 4 uL de RNase (10mg/L). Em microtubo foi

coletado e dissolvido, fazendo uso de um palito, um inóculo da bactéria. Foi adicionado alíquota de 200uL da solução II(0.2m NaOH e SDS 1%) e em seguida 150 uL de solução III (7.5NH₄OAc), misturadas por inversão. O volume foi centrifugado por 3 minutos e o sobrenadante transferido para novos microtubos contendo solução 300uL de Isopropanol. O volume foi novamente misturado por inversão e centrifugado por 5 minutos. O pellet restante foi lavado 2 vezes com ETOH 80%, seco e ressuspendido em água milliQ.

4.5.6 Digestão do plasmídeo de E.coli

Foi feito um gel de agarose (1%) para verificar o tamanho dos plasmídeos extraídos. A partir daí, foi selecionado 4cepas que apresentaram bandas mais escuras no gel para proceder novamente a extração de plasmídeos dessa vez em larga escala. Para isso foi utilizado o kit *PureYeldTM PlasmidMiniprep System* (PromegaCo., Madison, WI, EUA).

4.5.7 Extração de pDNA de bactéria – Triton – prep (media escala)

As células foram raspadas das placas contendo meio LA e suspendidas em 2mL de tampão de lise (lisozima, Tris, EDTA, Sucrose e ribonuclease) e incubado em gelo por 30 minutos. Após esse período foi adicionado 1mL de TET (3X) de Mix de lise (Triton X-100, EDTA,Tris e Água), misturado e centrifugados por 10 minutos em tubos abertos. O sobrenadante foi coletado e adicionado 1V de solução saturada de fenol, extraído e centrifugado por 5 minutos 4°C 4000rpm. Coletou-se a fase aquosa e 1/20V de NaCl 5M, 3 V de ETOH 100% foi adicionado e novamente centrifugado por 10 minutos 4°C 4000rpm. O precipitado foi ressuspendido em 300 uL NH₄OAc 2M, adicionado 1 mL ETOH 100%, misturado, centrifugado em temperatura ambiente por 5 minutos. O precipitado foi lavado 2x com ETOH80%. As amostras foram secas em speed vac e suspendido em 100uL de H₂O.

4.5.8 Transformação de leveduras

Foi coletado uma alçada da colônia de *S. cerevisiae* a ser transformada e inoculada em 10ml de YPD (pré-inóculo). A cultura foi mantidasob agitação de 140 rpm a 30°C por 16 horas e transferido, no dia seguinte, 0.5ml do pré-inóculo em 10ml de YPD fresco (OD a 600 nm ~0.1) . O material foi novamente incubado por 4 horas a 140rpm, 30°C; (OD 600nm entre 0.6 e 1.0). Em seguida, foi transferido para tubo cônico 15ml, centrifugado a 1800rpm

ou 600g a 21°C por 3min, descartado o sobrenadante e adicionado 5ml de TEL (10mM Tris-Cl pH7.5, 1mM EDTA, 0.1M Acetato de Lítio) e ressuspendido. O volume foi novamente centrifugado a 1800rpm a 21°C por 3 minutos, descartado o sobrenadante e ressuspendido em 0.2ml de TEL. Alíquota de 100µl foi adicionada em cada tubo, 5µl de DNA *carrier* desnaturado (Salmão) foi adicionado na parede superior do microtubo e sobre esta gota adicionado 5µl do DNA a ser transformado (1-10g). A gota foi deslocada para baixo do tubo (junto as células) e deixado agir por 15 minna bancada. Alíquota de 0,7ml de PEG (4000) 40% em TEL foi adicionado e deixado agir por 30 min em temperatura ambiente. Os tubos foram transferidos parabano Maria (42°C por 10min.), Adicionado 0,7ml de TE em cada tubo e centrifugado a 13500rpm por um minuto. O sobrenadante foi descartado e 1ml de TE foi adicionado. O tubo foi invertido e descartado o TE e ressuspendido com o que sobrou. Este volume foi semeado em meio WO seletivo apropriado. Os clones crescidos foram selecionados para posterior testes de retenção de metais pesados.

4.6 Transformação de *Trichoderma* sp. por *Agrobacterium tumefaciens*

4.6.1 Teste de sensibilidade das cepas de *Trichoderma* sp. frente à higromicina B

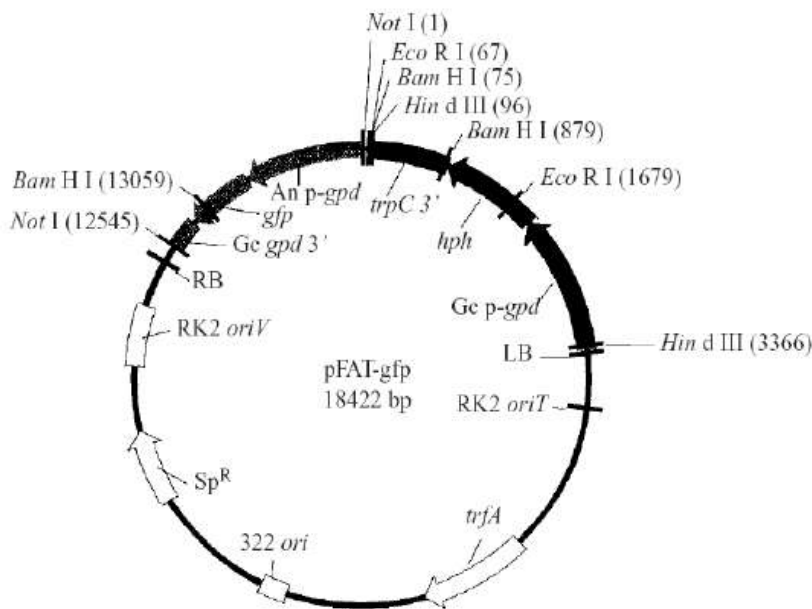
A inibição do crescimento de *Trichoderma* pelo antibiótico higromicina B foi determinada antes dos experimentos de agrotransformação. Para a determinação da CIM (concentração inibitória mínima) a linhagem fúngica foi inoculada em placas de petri contendo meio BDA (Batata Dextrose Ágar, Merck) contendo diferentes concentrações de higromicina B (0; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µg.mL⁻¹). Para cada concentração de higromicina B foram avaliada três cultivos. As culturas foram incubadas a 28 °C durante sete dias e então o crescimento do fungo foi avaliado e a CIM determinada.

4.6.2 Cepas de *A.tumefaciense* vetor de transformação

A. tumefaciens linhagem EHA105 contendo o vetor de transformação de fungos pFAT-gfp (Figura 2) foi gentilmente cedida pela Dra. Léia C. de Lima Fávaro (Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil), para a realização dos estudos desse trabalho. O vetor binário de transformação presente na linhagem EHA105 foi cedido à Dra. Léia C. de Lima Fávaro pelo Dr. Kim M. Plummer (CSIRO Plant Industry,

Austrália). Esse vetor contém, na região do T-DNA, o gene de resistência a higromicina B (*hph*) de *E. coli*, sob controle do promotor do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpd*) de *Glomerella cingulata*, bem como o gene da proteína verde fluorescente (*gfp*), sob controle do promotor do gene *gpd* de *Aspergillus nidulans* (Figura 2) (FITZGERALD et al., 2003).

Figura 8 - Vetor de transformação pFAT



(RB) borda direita do T-DNA; (LB) borda esquerda do T-DNA; (*hph*) gene de resistência a higromicina B de *E. coli*; (*trpC3'*) sinal de terminação transcricional do gene *trpC* de *A. nidulans*; (An p-*gpd*) promotor do gene gliceraldeído-3-fosfato de *A. nidulans*; (Gc p-*gpd*) promotor do gene *gpd* de *G. cingulata*; (Gc *gpd 3'*) sinal de terminação transcricional do gene *gpd* de *G. cingulata*; (Sp^R) gene de resistência a espectinomicina; (RK2 *oriV*) origem de replicação vegetativa RK2; (RK2 *oriT*) origem de transferência RK2; (322 *ori*) origem de replicação de pBR322; (*trfA*) gene de replicação *trfA* de RK2; (*gfp*) gene da proteína verde fluorescente pGreenLantern (Life Technologies). Fonte: Fitzgerald et al. (2003).

4.6.3 Transformação genética de *T. por A. tumefasciens*

A transformação da linhagem fúngica foi realizada de acordo com o protocolo descrito por De Groot et al. (1998) com modificações. A *tumefasciens* linhagem EHA105, carregando o plasmídeo pFAT-gfp, foi construído por Fitzgerald et al. (2003) recuperada do estoque em

glicerol, cultivada durante 72 horas a 28° C em meio YEP sólido suplementado com espectinomicina (200 mg.mL⁻¹) erifampicina (100 mg.mL⁻¹). Uma colônia isolada foi transferida para frasco de vidro contendo 30 mL de meio YEP líquido suplementado com espectinomicina (200 mg.mL⁻¹) e rifampicina (100 mg.mL⁻¹) e incubada a 28° C por 16 horas sob agitação (180 rpm). Uma suspensão de células da agrobactéria foi diluída para uma densidade óptica (DO₆₀₀) de 0,15 em meio de indução (10 mM de K₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄, 2,5 mM de NaCl, 2,0 mM de MgSO₄, 0,7 mM de CaCl₂, 9,0 µM de FeSO₄, 4,0 mM de (NH₄)₂SO₄, 0,5% (v/v) de glicerol, 10 mM de glicose e 40 mM de ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico esterilizado por filtração, pH 5,3, e adicionado ao meio de cultura após autoclavagem) na presença ou ausência de acetoseringona (AS) (Fluka), na concentração de 200 mM em volume final de 20 mL. As células foram incubadas a 28°C sob agitação (180 rpm), por um tempo adicional até que a cultura alcançasse DO₆₀₀ de 0,7. Nas condições utilizadas, o tempo de indução de competência foi de aproximadamente 8 horas. No intervalo de crescimento da cultura bacteriana, conídios da linhagem fúngica foram suspensos em água e contados em câmara de Neubauer. A suspensão de conídios foi misturada com 30 mL de meio BD (caldo de 200 g de batata e 20 g de dextrose em 1 L de água, [pH 6,0]) e incubada a 28°C sob agitação (180 rpm) para indução da germinação dos conídios. Após 8 horas, a suspensão de conídios foi centrifugada e ressuspensa em água destilada para ajustar a concentração a 1 x 10⁸ conídios.mL⁻¹. Em seguida, essa suspensão de conídios foi misturada às suspensões de *Agrobacterium* (DO₆₆₀ = 0,7) de modo a obter a concentração de 1 x 10⁷ conídios.mL⁻¹ num volume de 20 mL, com e sem AS (200 mM ou 400 mM). Essa mistura foi semeada (200 mL) sobre membrana de papel de filtro (8 mm de porosidade e 90 mm de diâmetro, Quanty®, Germany) ou membrana de náilon (0,45 mm de porosidade, Amersham Hybond N+), que estavam posicionadas sobre meio de indução sólido (10 mM de K₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄, 2,5 mM de NaCl, 2,0 mM de MgSO₄, 0,7 mM de CaCl₂, 9,0 µM de FeSO₄, 4,0 mM de (NH₄)₂SO₄, 0,5% (v/v) de glicerol, 5,0 mM de glicose, 20g de ágar e 40 mM de ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico esterilizado por filtração, pH 5,3, e adicionado ao meio de cultura após autoclavagem) contendo AS (200 mM ou 400 mM) ou não (placas controle). As culturas foram incubadas a 25°C durante 36 horas. Após esse período, que é denominado tempo de co-cultivo, as membranas foram transferidas para placas contendo meio de cultivo BDA (Merck) suplementado com 200 µg.mL⁻¹ de higromicina B (Invitrogen Life Technologies) e 200 µg.mL⁻¹ de cefoxitina sódica (Eurofarma) e incubadas a 28°C por 15 dias. Em metade das placas foram adicionados 5 mL de meio BDA (Merck) sólido suplementado com 200 µg.mL⁻¹ de higromicina B e 200 µg.mL⁻¹ de cefoxitina sódica sobre a

membrana. A cefoxitina sódica é usada para eliminar a bactéria, e a higromicina B para selecionar as colônias fúngicas transformantes. As placas foram avaliadas 5, 10 e 15 dias após a transferência das membranas. As colônias resistentes a higromicina B, visualizadas após 5, 10 e 15 dias, foram contadas e repicadas para placas de Petri contendo meio de cultivo seletivo (BDAsuplementado com 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de higromicina B) para posterior purificação e armazenamento. Foram realizados dois experimentos de transformação, mantendo as mesmas condições, com o objetivo de avaliar a consistência do protocolo adotado no que diz respeito à repetibilidade e capacidade de obtenção de transformantes.

4.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Microscopia eletrônica de transmissão foi realizada com o emprego das cepas de *S. cerevisiae* e *Trichoderma* antes e após a transformação Genética. Uma cepa de *Trichoderma harzianum*, isolada da água, sendo esta resistente a todos os metais pesados testados no presente trabalho (Pb, Cd, Cr e Hg).

A cepa foi cultivada em caldo LB (marca?) acrescido de Chumbo, Cádmio, Cromo, Mercúrio, caldo multimetals e controle negativo. A partir do crescimento dos fungos (5 dias) o caldo foi filtrado a fim de se obter biomassa que foi enviada para o setor de microtomia para a realização dos cortes. Os cortes foram examinados em microscópio eletrônico JEOL no departamento de Física da Universidade de São Paulo.

4.7.1 Preparo das amostras para a microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a análise de MET, as amostras foram fixadas em tampão cacodilato (2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, 0,001M de CaCl_2 e 0,05M de tampão cacodilato de sódio, a pH7,2) durante 3 horas. Após esta incubação inicial foram feitas três transferências dos materiais, com incubação em cada uma delas de 15 minutos em tampão cacodilato de sódio 0,1M. Posteriormente o material foi fixado em OsO_4 (1% no mesmo tampão por 2 horas a 4°C. O material foi lavado três vezes por 5 minutos em solução salina (NaCl 0,9%) e corado utilizando solução de acetato de uranila (2,5%) por 16 horas a 40°C. Em seguida, as amostras foram desidratadas em série de concentrações de acetona nas concentrações de 25, 50, 75, 90 (2 vezes) e 100% (3 vezes), sendo a imersão de 10 minutos em cada diluição, com excessão da acetona pura, onde a imersão foi feita por 20 minutos. Após a desidratação, o material foi embebido em resina spurr nas concentrações crescentes de resina, sendo

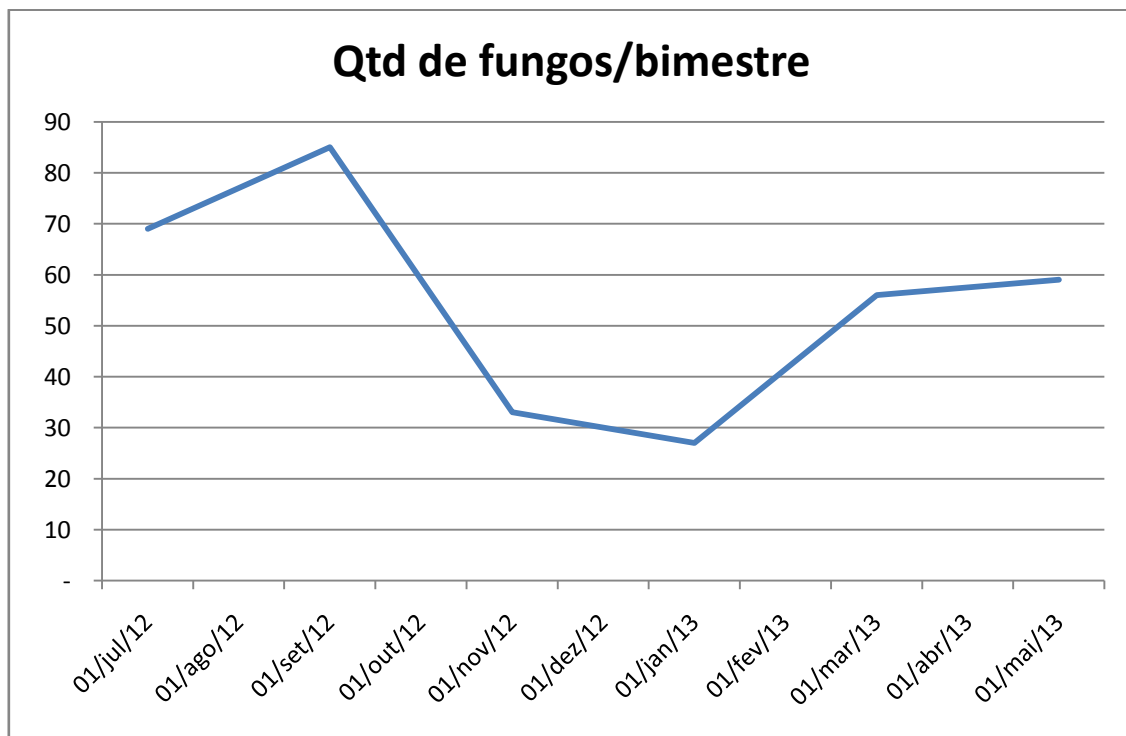
posteriormente emblocado por 48 horas a 60°C em estufa. As secções foram cortadas em ultramicrotomo e os cortes foram corados utilizando acetato de uranila 2,5% por 10 minutos e citrato de chumbo por 6 minutos.

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento e identificação de fungos

Foram isoladas durante o estudo, 340 espécies de fungos nas amostras de água e sedimento provenientes de pontos de coletas dos rios Tietê e Represa Billings. Durante o período de amostragem, setembro foi o período que mais se isolou fungos, como mostra a figura 8.

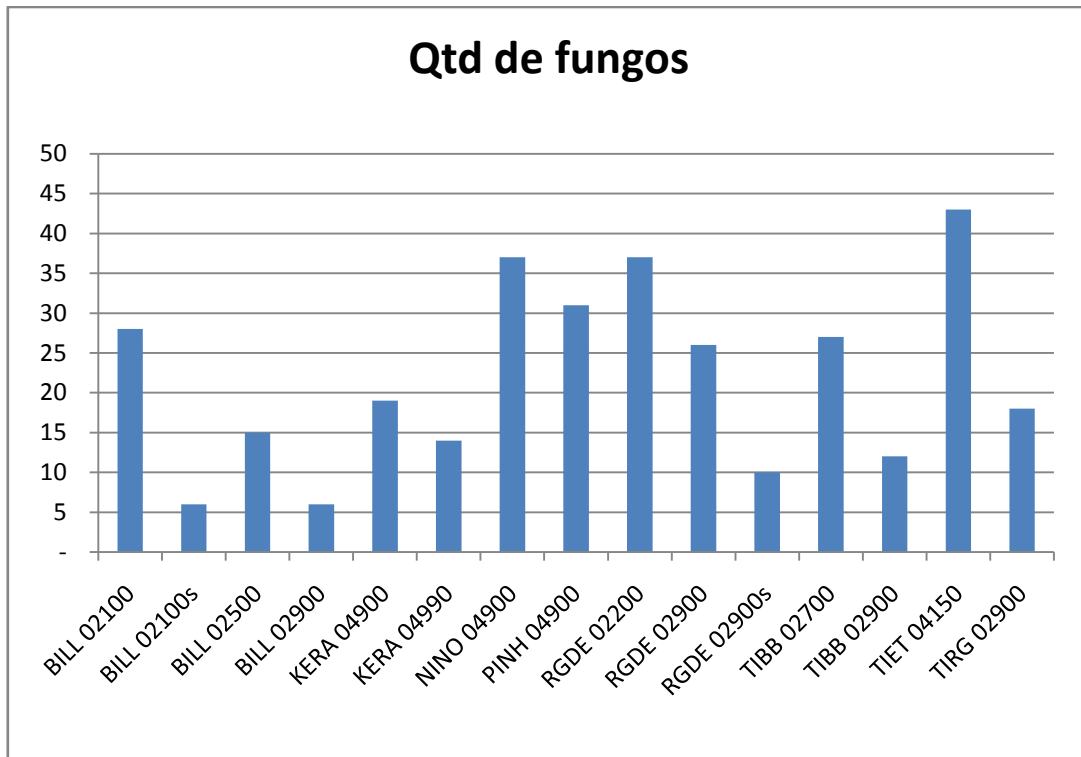
Figura 9 -Quantidade de fungos isolados por bimestre



Na figura 9, está representada a distribuição da quantidade de fungos isolados em cada ponto de amostragem ao longo do ano durante as 6 datas de coleta. Nota-se que o mês de setembro foi prevalente em termos de quantidades de fungos isolados. A região onde podemos observar maior quantidade de isolados ao longo do ano foi no ponto TIET 04150 (Rio Tietê - Ponte na Rod. Ayrton Senna, à montante do Parque Ecológico, antes da saída 19. Aeroporto de Guarulhos. Guarulhos - 23 28 36 / 46 29 55), seguido da região NINO 04900 (Ribeirão dos Meninos - Ponte Av. do Estado, na divisa dos municípios de São Paulo e São Caetano do Sul. São Paulo. - 23 36 00 / 46 34 43) e RGDE 02200 (Represa do Rio Grande -

No Clube Prainha Tahiti Camping Náutica, na altura do Km 42 da Rodovia SP-31. Ribeirão Pires. - .23 44 23 / 46 26 44) ambos situados na UGRHI 6.

Figura 10 - Quantidade de fungos isolados por ponto de amostragem



Os isolados fúngicos, foram identificados através de provas morfológicas (macro e microscópicas) e sequenciamento da região ITS. Todos os fungos isolados apresentaram resistência a pelo menos um íon de metal pesado (Pb, Cd, Cr e Hg) usado para o screening.

Entre os fungos filamentosos isolados (n=262 – 77%), os gêneros *Penicillium* (16%), *Trichoderma* (11%), *Aspergillus* (7%), *Cladosporium* (5%), *Fusarium* (4%) e *Epicoccum* (1%) foram os mais frequentes.

Dentre os 78 isolados fúngicos, classificados como leveduras foram identificados utilizando morfologia clássica e sequenciamento do gene ITS. Dentre as leveduras isoladas, foram identificadas com maior frequência as seguintes espécies: *Rhodotorula* spp. (5%); *Candida* spp. (4%); *Pichia* spp. (3%); *Trichosporon* spp. (3%); *Cryptococcus* (2%).

Os fungos pertencentes aos seguintes generos foram isolados uma única vez em todo o período de coleta: *Pleosporales* sp.; *Ascochyta* sp.; *Peniophora* sp.; *Pseudozyma* sp.; *Phialophora* sp.; *Bipolaris* sp.; *Leptosphaeria* sp.; *Emericellopsis* sp.; *Plectospharella* sp.;

Capnodium sp.; *Cerebella sp.*; *Curvularia sp.*; *Hormonema sp.*; *Evlachovaea sp.*; *Exophiala sp.*; *Debaryomyces sp.*; *Phialemonium sp.*; *Lophiostoma sp.*; *Parastagonospora sp.*; *Wickerhamomyces sp.*; *Phaeosphaeria sp.* *Dothideomycetessp.*; *Microdochium sp.*; *Stagonosporasp.*; *Beauveria sp.*

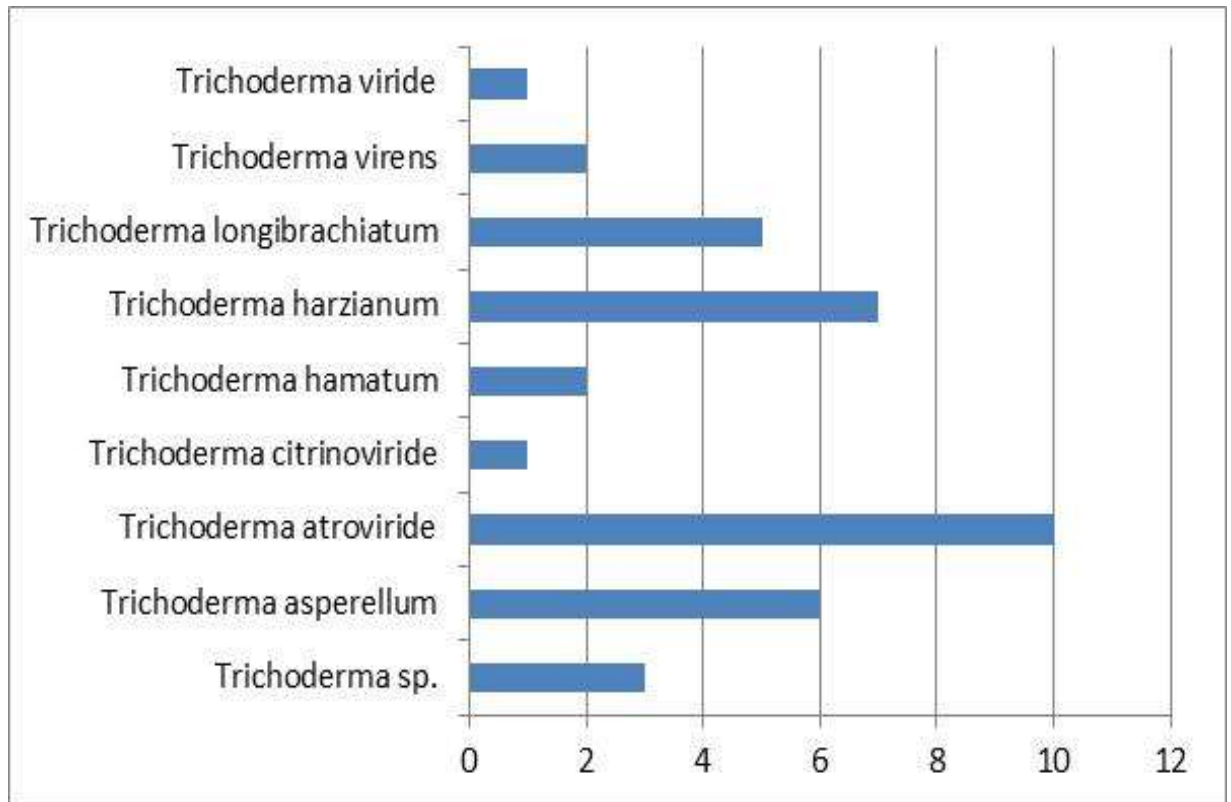
5.2 Avaliação da resistência e velocidade de crescimento radial dos fungos frente aos íons de metais pesados

Os testes de crescimento radial revelaram as cepas mais eficientes no crescimento em meios contendo altas concentrações de metais pesados. Os resultados demonstraram que a totalidade dos fungos isolados foi resistente a pelo menos um dos metais pesados testados. (Anexo 1).

Dos isolados testados, uma cepa *Trichoderma sp.* demonstrou maior velocidade de crescimento radial frente a cada um dos metais pesados. O fungo apresentou VCR de 0,9cm/dia (Pb), VCR de 0,7cm/dia (Cd), VCR de 0,8cm/dia e VCR de 0,9cm/dia(Hg).

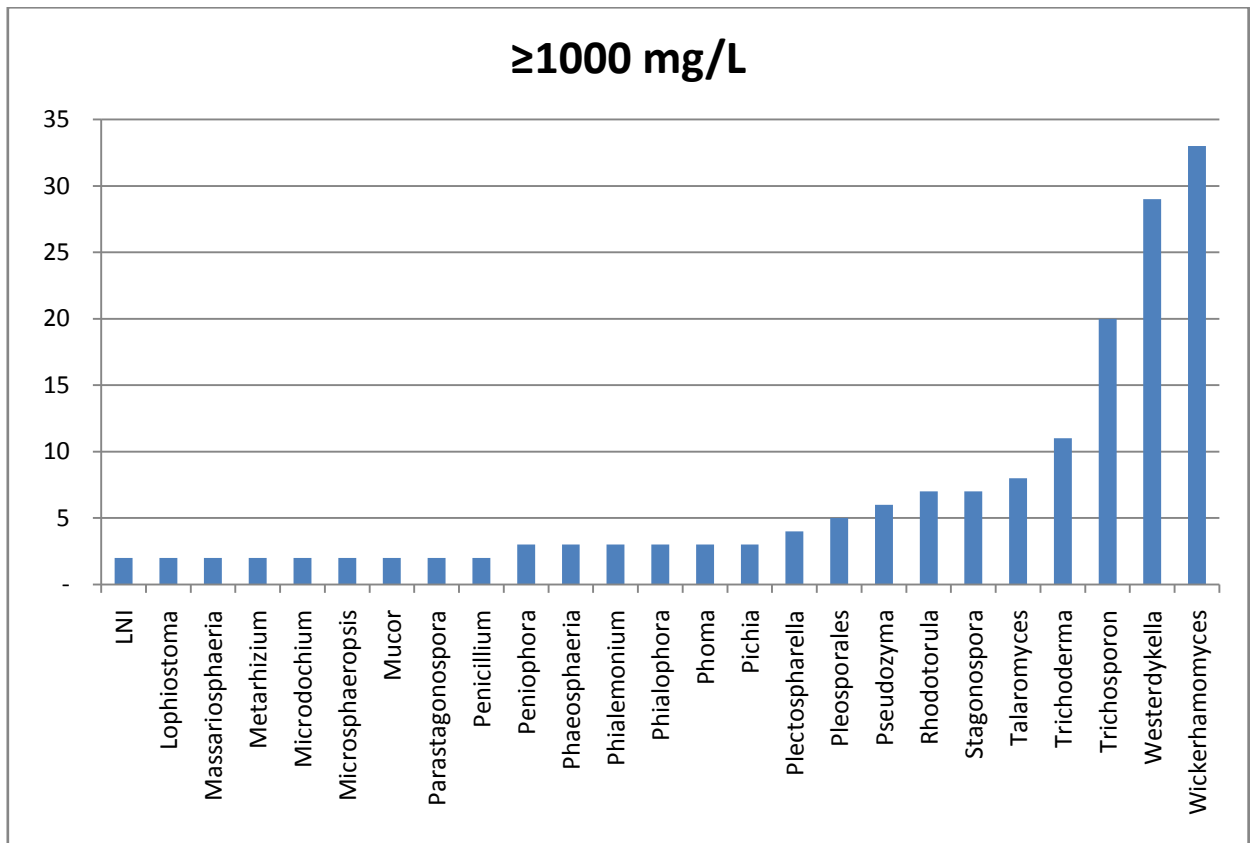
Em nosso estudo, no geral, fungos do gênero *Trichoderma* se comportaram de forma diferente dos outros gêneros fúngicos, crescendo muito rapidamente logo no primeiro dia após a inoculação dos conídios e se espalhando pela placa de Petri, dificultando a leitura do crescimento radial. Por esse motivo, os testes de crescimento radial com isolados fúngicos desse gênero foram repetidos, utilizando placas de Petri maiores (150 mm) a fim de obter uma avaliação mais precisa do crescimento radial destes fungos em meio contendo os metais pesados.

Em nosso estudo a prevalência de *Trichoderma atroviride* (n=10), acompanhado de *T. harzianum* (n=7), seguido por *T. asperellum* (n=6) e *T. longibrachiatum*(n=5), demonstra a capacidade de este gênero fúngico habitar locais com altas concentrações de metais pesados sem prejuízo para a espécie, mantendo a integridade da célula.

Figura 11 - Prevalência de fungos do gênero *Trichoderma*

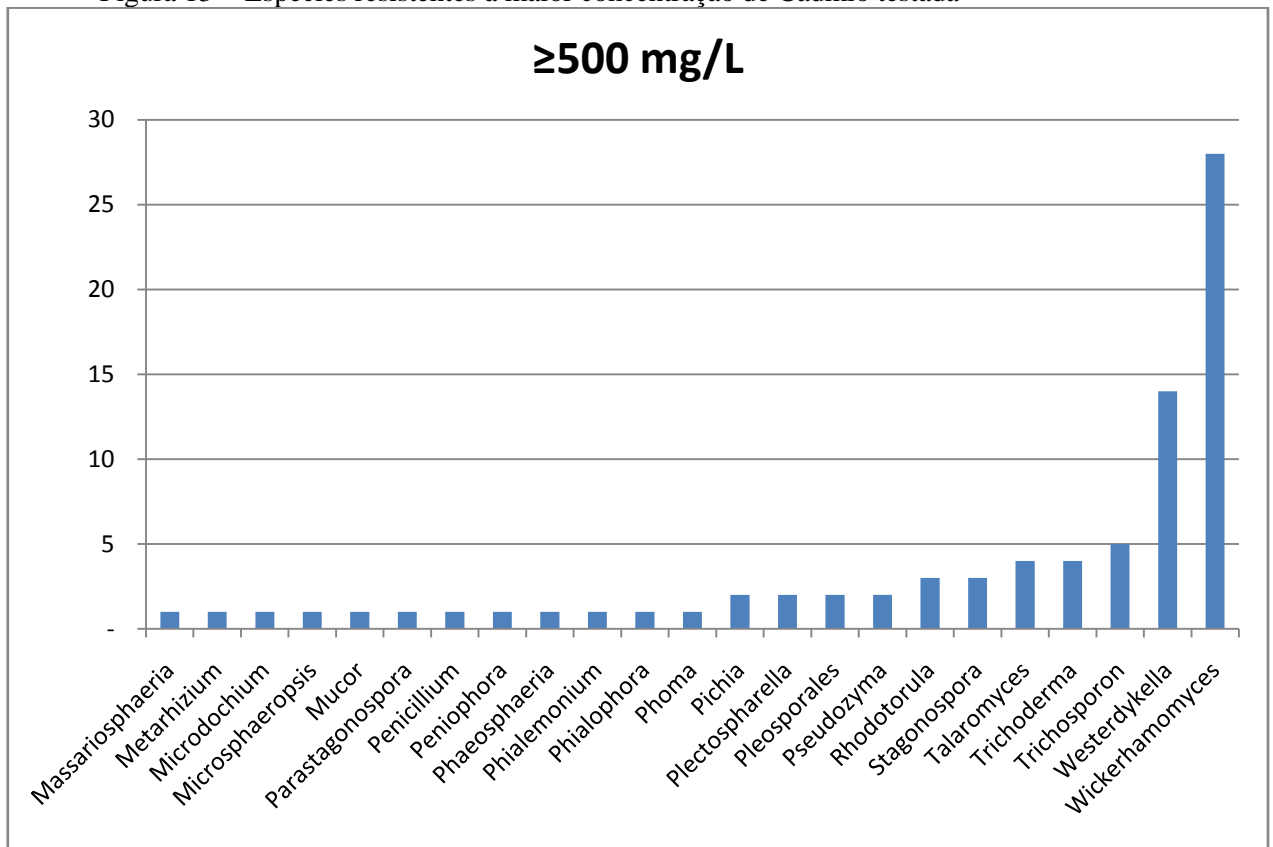
Todos os 340 isolados fúngicos foram submetidos aos testes de retenção de metal pesado obtendo altos valores de Velocidade de Crescimento Radial. Assim sendo 214 (63%) isolados cresceram na presença de Chumbo na maior concentração testada (1g/L). Além de fungos do gênero *Trichoderma*, uma cepa do fungo *Curvularia afinis* também demonstrou alta capacidade de crescer em meio contendo alta concentração do metal pesado Chumbo. Esta cepa apresentou uma velocidade de Crescimento Radial de 0,3cm/dia.

Figura 12 - Espécies resistentes à maior concentração de Chumbo testada



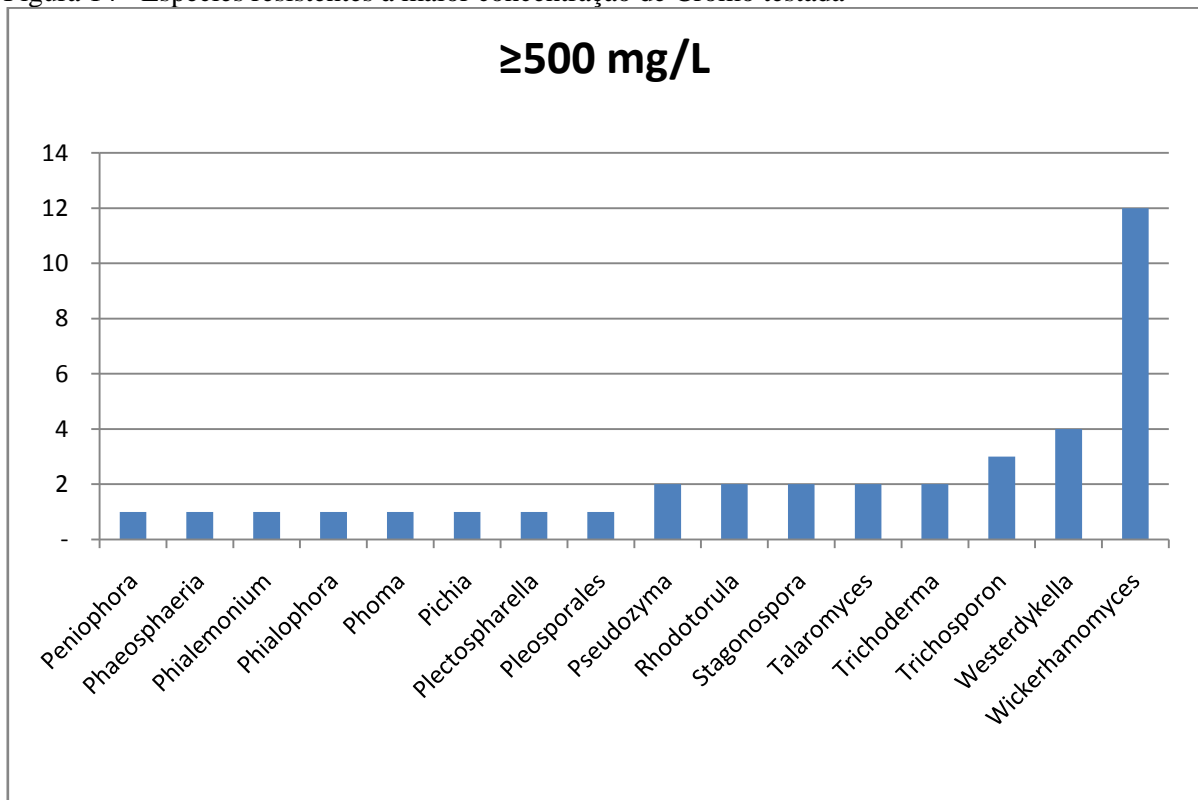
Destes 340 isolados submetidos ao teste fúngicos, 96 (28%) isolados foram resistentes ao Cádmiio na maior concentração testada de 0,5g/L. Seguido dos gêneros *Trichoderma*, uma cepa do gênero *Penicillium* apresentou alta Velocidade de Crescimento Radial na maior concentração testada que foi de 0,26cm/dia na concentração de 0,5g/L de Cádmiio. Todos os isolados (sem exceção) que foram submetidos ao teste de crescimento radial em qualquer concentrações do íon Cádmiio, não conseguiram esporular.

Figura 13 - Espécies resistentes à maior concentração de Cádmiu testada



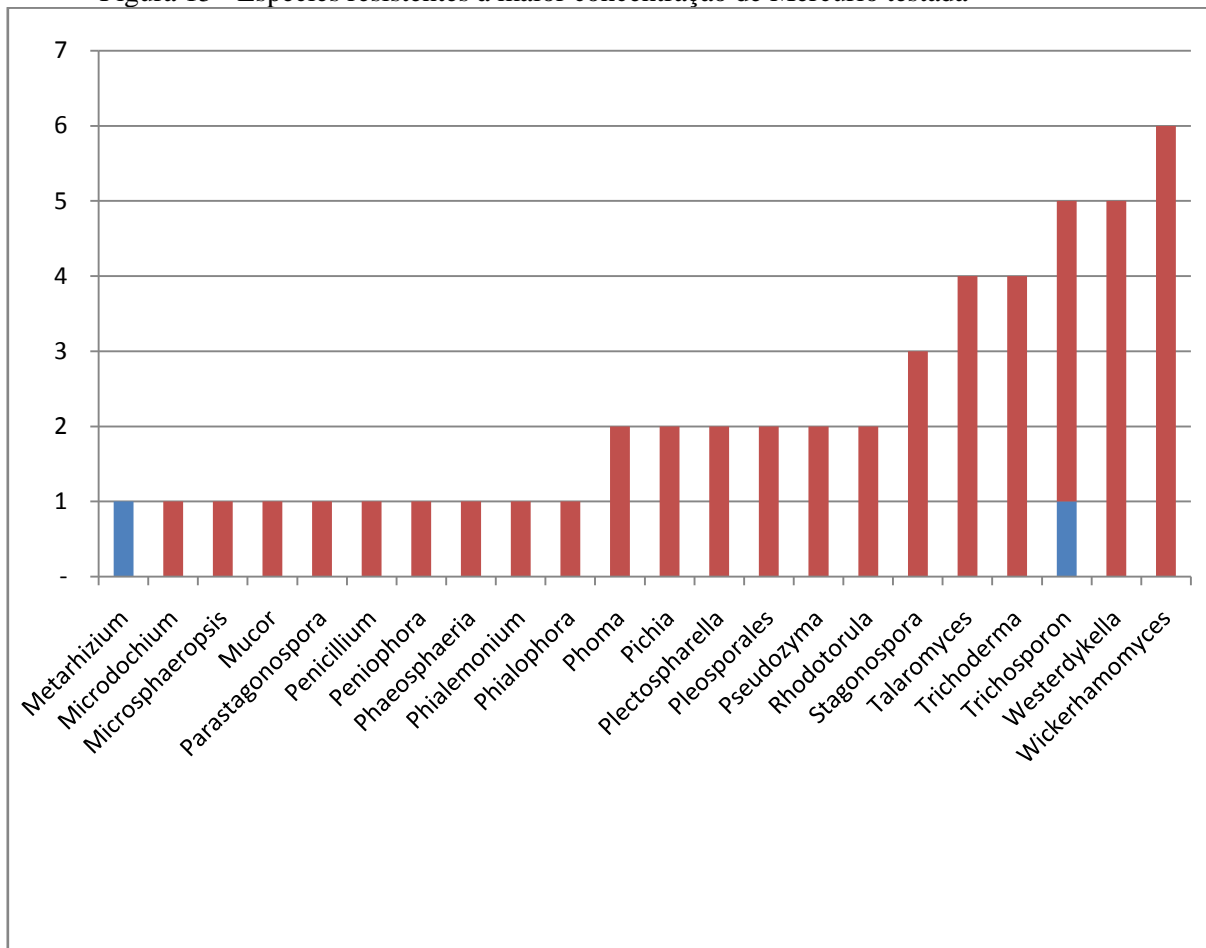
38/340 (11%) isolados se apresentaram resistentes ao Cromo na concentração mais alta testada de 0,250g/L. Fungos do gênero *Trichoderma* foram os mais eficientes em crescer em meios acrescidos de íon Cromo e em seguida, um fungo do gênero *Aspergillus* apresentando uma Velocidade de Crescimento Radial de 0,42cm/dia.

Figura 14 - Espécies resistentes à maior concentração de Cromo testada



Dos isolados fúngicos testados, dois isolados apresentaram resistência ao Mercúrio na concentração de 0,250g/L desde o primeiro dia de leitura do teste. 52 (15%) isolados cresceram com alta taxa de Velocidade de Crescimento Radial na concentração 0,125g/L e 0,062g/L. Houve crescimento em concentrações mais altas também, no entanto, o crescimento aconteceu a partir do segundo e terceiro dia. Além dos fungos do gênero *Trichoderma*, o fungo *Microsphaeropsis arundinis* apresentou Velocidade de Crescimento Radial de 0,24 cm/dia.

Figura 15 - Espécies resistentes à maior concentração de Mercúrio testada



Finalmente, 93 dos 160(28%) isolados fúngicos testados apresentaram crescimento em todos os meios contendo os quatro metais pesados, indicando que esses microrganismos talvez sejam os mais indicados ou apropriados para o fim a que se destina essa pesquisa, visto que estes possuem mais estratégias de sobrevivência, pois são mais versáteis em seus mecanismos de resistência e talvez de retenção de metais pesados. Basta saber se são eficientes na retenção destes metais através da superfície celular ou por outros mecanismos.

Dentre os isolados testados, estão algumas leveduras que apresentaram altas taxas de Velocidade de Crescimento Radial. Os resultados dos testes indicam que a população microbiana que habita locais poluídos pode ter a capacidade para resistir a concentrações muito mais altas e, assim, os esforços devem ser direcionados em revelar e explorar o seu potencial real.

5.3 Transformação Genética de *S. cerevisiae*

Em relação à transformação de levedura, a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* foi transformada com os vetores YIp351 e YCp22 contendo o inserto do gene EC20 que tem a capacidade de quelar metais pesados. Os transformantes foram testados posteriormente quanto à capacidade aumentada de quelar metais pesados em sua superfície celular.

5.4 Transformação Genética de *Trichoderma sp.*

Em relação à otimização do protocolo de transformação fúngica, os fungos testados (espécies do gênero *Trichoderma*) foram transformados utilizando a bactéria *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor pFAT possibilitando assim a transformação fúngica dessa vez contendo o gene de interesse EC20.

5.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Em relação à Microscopia Eletrônica de Transmissão, a cepa testada de *Trichoderma harzianum*, mostrou através de imagens e análise dos EDS (Energy-Dispersive Spectroscopy) uma retenção tanto na superfície celular quanto no seu interior como mostrada na figura abaixo (Fig 5).

Fig 16 – Microscopia Eletrônica de cepa de *Trichoderma harzianum*

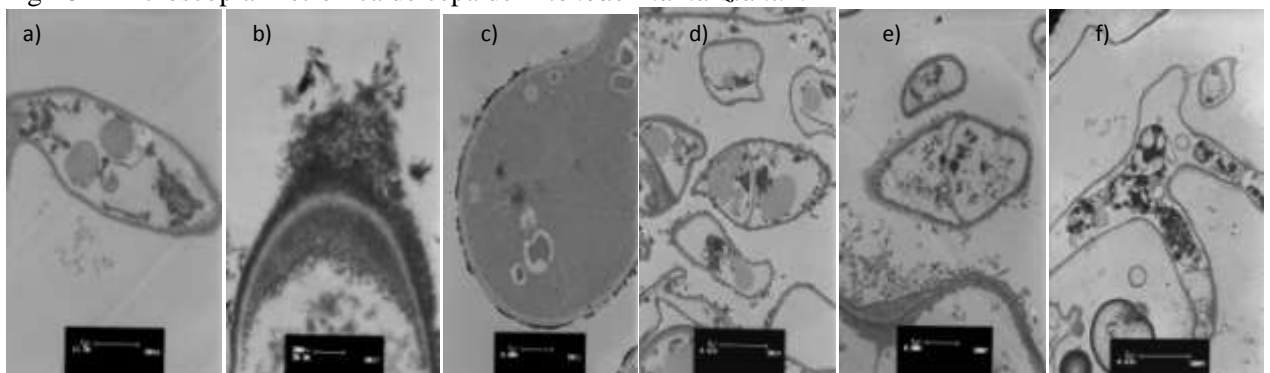


Figura17 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (a) antes e (b) depois da transformação do *S. cerevisiae* frente ao Chumbo

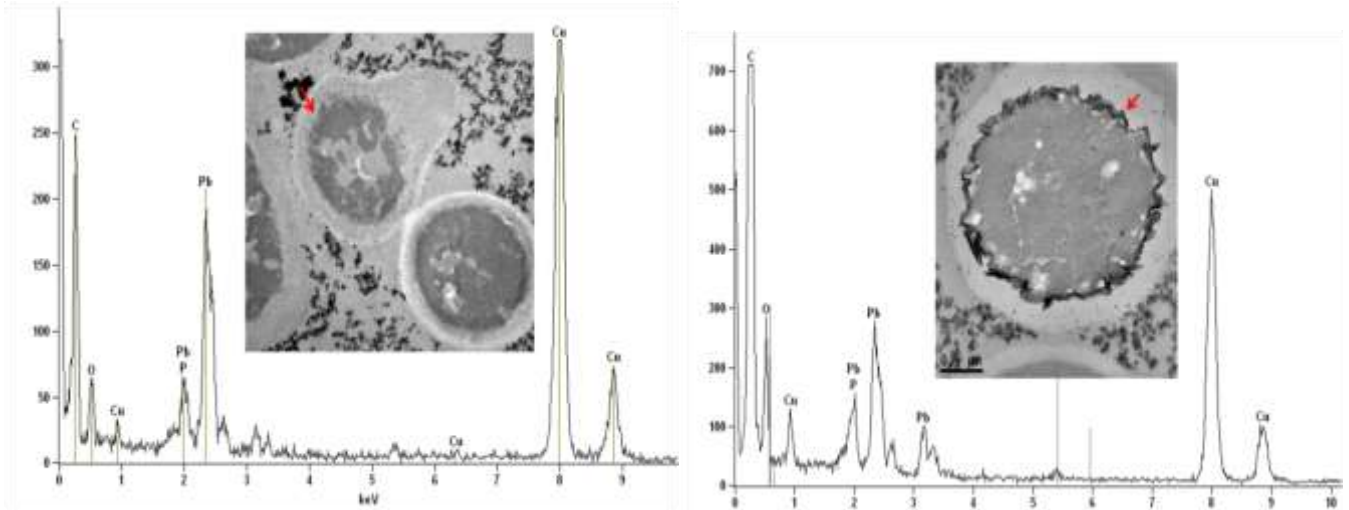


Fig. 18 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (a) antes e (b) depois da transformação do *S. cerevisiae* frente ao Cádmi

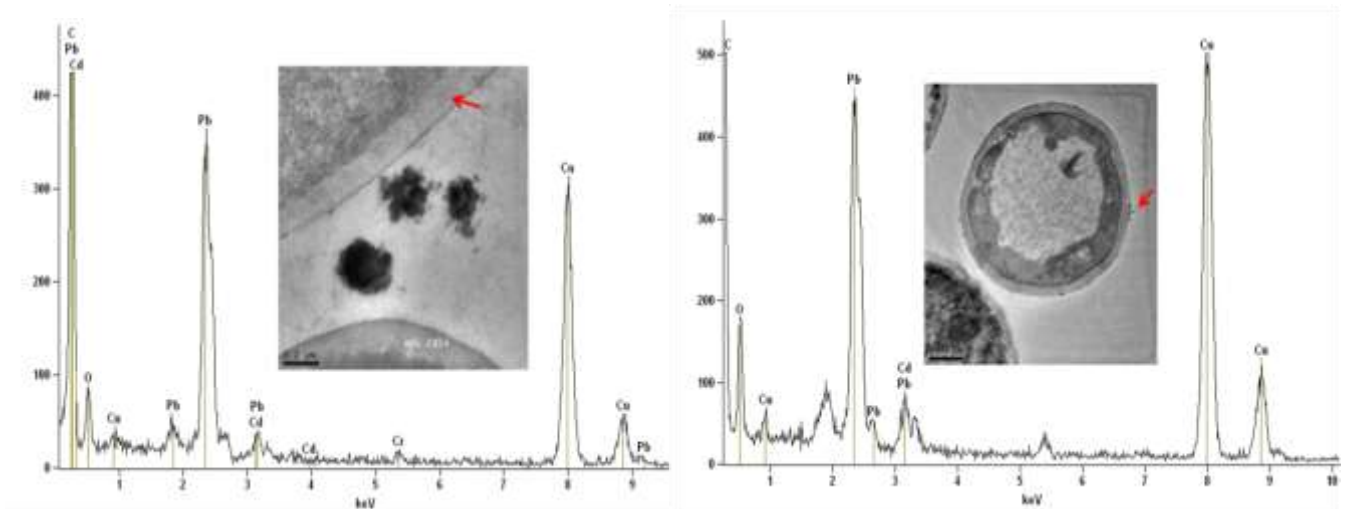


Fig.19 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (a) antes e (b) depois da transformação do *S. cerevisiae* frente ao Cromo

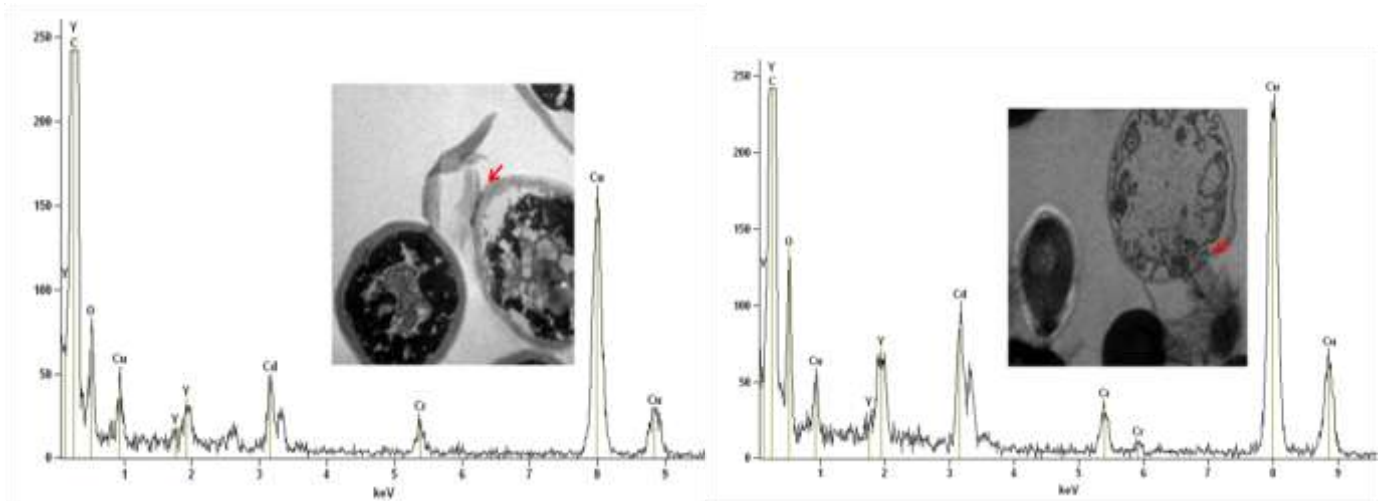
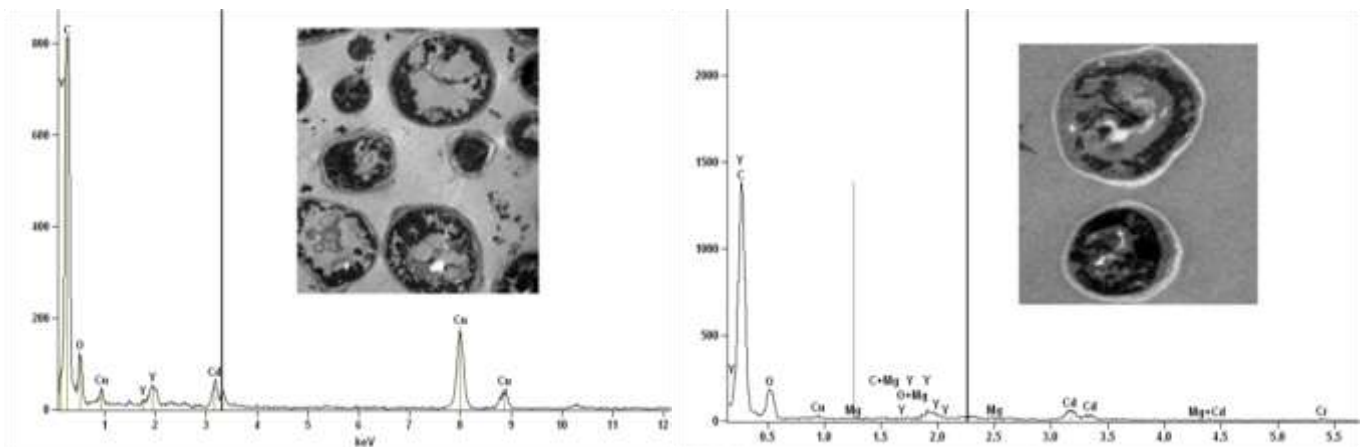


Fig. 20 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (a) antes e (b) depois da transformação do *S. cerevisiae* frente ao Mercúrio



6 DISCUSSÃO

Foram isoladas durante o estudo, 340 espécies de fungos nas amostras de água e sedimento provenientes de pontos de coletas dos rios Tietê e Represa Billings. Os isolados fúngicos, foram identificados através de provas morfológicas (macro e microscópicas) e sequenciamento da região ITS. Todos os fungos isolados apresentaram resistência a pelo menos um íon de metal pesado (Pb, Cd, Cr e Hg) usado para o screening. O isolamento de tais fungos demonstra a ubiquidade e a resistência destes em relação à ambientes contaminados por metais pesados. Os testes de crescimento radial revelaram as cepas mais eficientes no crescimento em meios contendo altas concentrações de metais pesados. Os resultados demonstraram que a totalidade dos fungos isolados foi resistente a pelo menos um dos metais pesados testados.

Assim como em nosso estudo, Joshi e colaboradores(2011) também revelaram maior prevalência de *Trichoderma viride* atribuindo a resistência elevada a tais metais, a composição da parede celular da célula fúngica composta, primariamente, de polímeros de quitina e glucanas os quais ajudam na ligação aos metais (MORLEY; GADD, 1998). Bishnoi (2007) apresentou resultados em relação ao fungo *T. viride* assimilando altíssimos níveis de resistência e retenção de Cádmio.

Em relação ao Cádmio, o padrão de crescimento fúngico observado é intrigante. Todos os isolados (sem exceção) que foram submetidos ao teste de crescimento radial em quaisquer concentrações do íon Cádmio, não conseguiram esporular, sendo assim, podemos supor que o Cádmio serve como fator de inibição de esporulação fúngica (JOSHI et al, 2011). Bioassorção de Cádmio por biomassas vivas e não vivas foram estudadas por diversos autores.

Um estudo de Dorea (2003) mostrou que isolados de *Aspergillus niger* poderia remover quantidades significativas de Chumbo a partir do meio de cultura suplementado com metais pesados, mas era menos resistente ao Cromo.

Pseudomonas spp. obtido a partir de cobaias Em um estudo conduzido por Upreti e colaboradores mostrou que a exposição de lactobacilos ao cromo ao longo do tempo pode gerar cepas resistentes capazes de tolerar melhor os metais. Em um estudo semelhante, (SHRIVASTAVA et al., 1994) mostrou que os lactobacilos e outras bactérias associados ao intestino, juntamente com algumas células do sistema imune do homem, podem transformar cromo à sua forma menos tóxica. Bactérias fecais humanos também podem se ligar e sequestrar cromo. É possível que em áreas geográficas em que a contaminação por metais

pesados é elevada, inadvertidamente, seres humanos ingerem estes organismos altamente resistentes.

A concentração de Mercúrio a qual houve crescimento imediatamente no primeiro dia foi relativamente menor do que a concentração dos outros metais, o que já era esperado devido ao seu nível mais elevado de toxicidade (SINHA et al., 2013), sendo algumas vezes maior que a dos outros metais.

Estudos demonstraram que certas cepas de lactobacilos parecem seqüestrar mercúrio e também pode ter mecanismos para a sua degradação (MONEY, 1999; ORLOVICH; ASHFORD, 1993).

Absorção de íons do metal pesado por leveduras é conhecida por envolver uma biossorção rápida de íons metálicos na parede da célula (BRADY; DUNCAN, 1994; KRAUTER et al., 1996) seguido por uma entrada mais lenta dependente de energia para o interior celular. A maioria dos metais que são interiorizados pela célula fúngica fica acumulada em grânulos de polifosfatos localizadas dentro e perto dos vacúolos ou também podem ficar ligados a proteínas de baixo peso molecular tais como metalotioneína e fitoquelatinas (VOLESKY et al., 1990; VOLESKY; MAY-PHILIPS, 1995).

Todos os 340 isolados fúngicos foram submetidos aos testes de retenção de metal pesado obtendo altos valores de Velocidade de Crescimento Radial. Assim sendo 214 (63%) isolados cresceram na presença de Chumbo na maior concentração testada (1g/L). Provavelmente, concentrações maiores deste íon poderia também proporcionar crescimento destes fungos.

Em organismos eucariotos, a proteína rica em cisteínas tem uma alta afinidade por vários íons potencialmente tóxicos e são utilizados na captação celular do metal. Porém, estas proteínas não apresentam a especificidade necessária para a remoção de um metal específico. No presente trabalho, uma proteína sintética análoga à fitoquelatina foi sintetizada para a construção de um fungo com capacidade aumentada de biossorver os metais pesados Chumbo, Cádmiu, Cromo e Mercúrio (PEREGO; HOWELL, 1997). Em trabalhos anteriores, foi ancorada essa mesma fitoquelatina sintética EC20 (BAE et al., 2001; REGINE; VOLESKY, 2000) na superfície celular de *E. coli* para aumentar a captação e bioacumulação de Mercúrio. Embora já se sabe que a fitoquelatina EC20 não apresenta especificidade de ligação para um determinado íon metálico, já se sabe que tenha diferentes graus de afinidade de ligações aos diferentes íons metálicos.

Neste trabalho foi construído um fungo leveduriforme contendo o gene que codifica a fitoquelatina EC20, visando melhorar sua capacidade de biossorção de íons Pb, Cd, Cr e Hg,

na superfície celular. Os dados apresentados mostraram que para o metal Chumbo, a melhora na retenção do metal foi muito significativa, seguido de uma melhora na capacidade de retenção de Cádmiio.

O gene foi inserido no vetor YCp22 e YIp351 obtendo-se os plasmídeos YCp22-EC20 e YIp351-EC20. Os sistemas construídos foram seqüenciados e confirmada a inserção, conforme desejado. Os plasmídeos foram mantidos na linhagem de *S. cerevisiae* sob pressão seletiva em meio LB.

Nos resultados de Concentração Inibitória Mínima (MIC) foi observado que o crescimento da linhagem recombinante de *S. cerevisiae* foi maior que o da linhagem selvagem, ambas cultivadas sob as mesmas condições.

Os resultados da Microscopia de Transmissão mostraram com clareza que a linhagem recombinante foi capaz de reter maior quantidade de metais pesados. Exceto para mercúrio, que não demonstrou uma melhora significativa de retenção, talvez devido ao seu potencial tóxico mais elevado quando comparado aos outros metais testados.

Os resultados obtidos mostraram que a linhagem recombinante apresentou uma melhora na capacidade de ligar a metais. Todavia, é importante ressaltar que há poucos trabalhos disponíveis na literatura relacionadas ao sistema de biocumulação de metais pesados por fungos geneticamente modificados.

Finalmente, os resultados obtidos neste trabalho confirmam a construção da linhagem *S. cerevisiae* com capacidade aumentada de retenção de metais pesados, indicando que o uso de fungos na biorremediação pode ser de grande auxílio para o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas com a finalidade de descontaminar ambientes poluídos por metais pesados.

Vale ressaltar que dentre os vários fatores envolvidos na disponibilidade de metais em solução, o pH é provavelmente o mais importante, pois determina a sua solubilidade, bem como os processos de adsorção e, conseqüentemente, a capacidade de biorremediação de um sistema. Além disso, a adsorção de metais pesados por fungos, é geralmente regulada pelo pH do meio. Cada íon de metal pesado apresenta uma particular cinética de adsorção em determinados valores de pH; enquanto íons de zinco e cádmio são abundantes em meios com pH entre 5.0 e 6.5, baixas concentrações desses íons são encontrados em meio com pH 8.0, além disso, precipitação em sólidos insolúveis ocorre em meio com pH maior que 6.0 para os íons Pb^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} e Cu^{+2} .

Para os metais chumbo e cádmio analisados neste estudo, a linhagem de *S. cerevisiae* cultivada na presença de metais apresentou maior capacidade de ligar metal em relação à

mesma linhagem cultivada na ausência de metais, assim como também em relação à linhagem controle (sem EC20sp). O metal pesado Cd⁺² é considerado extremamente perigoso devido à sua toxicidade e à grande utilização pela indústria, o que acarreta a produção de um volume considerável de resíduos que são lançados no meio ambiente. Por estas razões, a maioria dos estudos tem contemplado avaliar o potencial biorremediador dos diversos sistemas frente a este metal em relação aos outros metais (HAFEZ et al., 1997).

Ressaltados esses pontos, é possível considerar que a linhagem *S. cerevisiae* construída neste trabalho é um excelente agente de biorremediação, pois, além de ser altamente resistente e colonizar ambientes contendo metais, mostrou também capacidade de acumular estes íons durante o crescimento da linhagem. Este resultado abre perspectivas de utilizar o próprio efluente contendo metal como meio de cultivo desse fungo, proporcionando uma concomitante biorremediação durante o crescimento celular (Biondo, 2012; Bishop, 20012).

O chumbo é um elemento extremamente tóxico e a busca por agentes biorremediadores para este íon tem sido alvo de diversos estudos com linhagens selvagens de bactérias como *Pseudomonas* e *Streptomyces*, no entanto, faltam na literatura estudos mais recentes e com linhagens melhoradas geneticamente.

A fim de comprovar, definitivamente, a ligação do metal na célula fúngica, bem como, localizar onde estava ocorrendo esta ligação, decidimos analisar as células por microscopia de transmissão eletrônica (MET). O emprego da MET é bastante difundido no estudo de materiais biológicos, pois permite a definição de imagens intracelulares, fornecendo informações sobre alterações de impossível visualização na microscopia de luz. Desta forma, pudemos verificar comparativamente que células incubadas com Pb⁺² foram capazes de se ligar a este metal, principalmente, na membrana externa do fungo e, que a linhagem transgênica *S. cerevisiae* apresentou-se recoberta por uma densa camada deste metal quando comparada à linhagem selvagem e em comparação aos outros metais. O conjunto desses resultados confirma que a linhagem *S. cerevisiae* construída neste trabalho apresenta, de fato, um aumento na capacidade de biorremediar soluções contendo metais, seja a partir de efluentes contendo apenas uma espécie de metal, seja em efluentes contendo vários metais. Vale ressaltar ainda que, em todos os experimentos, a viabilidade celular não foi alterada durante os experimentos de adsorção, comprovando que os mecanismos de resistência de *S. cerevisiae* estavam ativos, protegendo as células do efeito tóxico dos metais. Além disso, o crescimento celular das linhagens recombinantes não apresentou significativa diminuição que comprometesse a produção de biomassa para biorremediação (MELGAR et al., 2007). Assim,

a linhagem transgênica *S.cerevisiae* pode ser considerada como um agente eficiente de biorremediação de ambientes contendo metais, principalmente quando a biomassa é cultivada na presença de metais. Além disso, o metal adsorvido pode ser recuperado, fato este que confere também a essa linhagem a capacidade de ser uma lixiviadora de metais.

O objetivo principal do trabalho de otimizar a capacidade de biorremediação de uma linhagem fúngica foi atingido, indicando que a estratégia de inserir genes codificadores de proteínas quelantes de metais no fungo é viável e contribui para o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas úteis para a preservação do meio ambiente.

7 CONCLUSÕES

- Todos os fungos isolados e testados foram resistentes a pelo menos um metal pesado testado;
- Fungos do gênero *Penicillium* foram os mais frequentemente isolados;
- Fungos do gênero *Trichoderma* apresentam alta resistência a todos os metais pesados testados
- Comprovada a construção do gene da fitoquelatina sintética
- Sequenciamento do gene ITS possibilitou a identificação de uma grande diversidade de fungos isolados no ambiente aquático;
- Fungos do gênero *Trichoderma* apresentaram maior VCR frente aos íons Chumbo, Cádmio, Cromo e Mercúrio;
- Fungo *Curvularia afinis* apresentou elevado VCR frente ao íon Chumbo;
- Fungo do gênero *Penicillium* apresentou elevado VCR frente ao íon Cádmio;
- Fungo do gênero *Aspergillus* apresentou elevado VCR frente ao íon Cromo
- A espécie *Microsphaeropsis arundinis* apresentou elevado VCR frente ao íon Mercúrio;
- Todos os isolados do gênero *Trichoderma* demonstraram maior velocidade de crescimento radial frente a todos os metais pesados testados, no entanto isso não definiu que fungos deste gênero sejam os mais eficientes na adsorção destes metais.
- Os vetores contendo o gene EC20 foram transformados com sucesso em cepa de *Saccharomyces cerevisiae*;
- A cepa de *Trichoderma harzianum* demonstrou a capacidade de retenção de metais pesados tanto na parede celular quanto em seu interior.
- O sistema de transformação mediado por *A. tumefaciens* se mostrou como ferramenta eficiente para a transformação fúngica.
- O fungo *S. cerevisiae* expressando EC20sp na membrana externa mostrou ter superior capacidade de ligar Cd^{+2} , Hg^{+2} , Pb^{+2} e Cr^{+2} em relação à levedura não recombinante
- Comprovada a localização do metal pesado na célula fúngica
- O fungo EC20sp não apresentou alterações quanto à capacidade de crescimento
- Avaliação da distribuição dos metais pesados na célula fúngica por Microscopia Eletrônica de Varredura e de Transmissão antes e depois da transformação genética fúngica;
- Melhoramento de linhagens fúngicas capazes de reter metais pesados na superfície celular.
- Fungo expressando EC20sp pode ser empregada em processos de biorremediação de efluentes contendo metais pesados.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, foi construída por manipulação genética a levedura *S. cerevisiae* com capacidade de biorremediar soluções contendo íons de metais pesados devido à presença da proteína quelante de metais EC20sp, ancorada na sua superfície celular. No entanto, o plasmídeo contendo a construção gênica precisa ser mantido sob pressão seletiva, o que representa uma limitação para uso em grande escala. Portanto, há a necessidade de estabilizar essa informação genética no cromossomo da levedura, de tal forma que, possamos vencer essa limitação e, de fato, empregá-la em processos de biorremediação em escala industrial. Para tanto, enviamos uma proposta de continuidade deste trabalho à FAPESP com o objetivo de estabilizar no genoma do fungo o sistema de expressão ancoragem da EC20sp e, posteriormente, utilizar essa linhagem estável para uso em biorreatores, para os testes em escala piloto, tanto com efluentes artificiais, quanto com aqueles reais. Outro aspecto a salientar diz respeito à contenção deste OGM na natureza. Para tanto, opção de morte celular programada pode permitir que após realizar a sua incumbência biorremediadora, o fungo no final do processo se suicide devido à expressão de uma nuclease que destrói o DNA microbiano, evitando a sua disseminação no meio ambiente. Considerando-se todos estes aspectos, o presente trabalho traz uma contribuição inovadora no Brasil, desenvolvendo geneticamente um microrganismo com potencial de realizar biorremediação de metais em efluentes, engajando-se na busca por processos eficientes e amigáveis ao meio ambiente, no sentido de buscar a diminuição dos rejeitos de metais que são produzidos em milhões de toneladas anualmente, e colaborar de forma objetiva na preservação dos recursos hídricos do planeta. Por fim, vale ressaltar que os resultados deste trabalho produziram um artigo já publicado que se encontra em anexo, e mais dois outros artigos sendo elaborados.

REFERÊNCIAS*

AHALYA, N.; RAMACHANDRA, T. V.; KANAMADI, R. D. Biosorption of heavy metals. **Res. J. Chem. Environ.**, v. 7, p. 71-78, 2003.

ANDERSON, I. C.; CAIRNEY, J. W. G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 769-779, 2004.

ARX, J. A. **The genera of fungi sporulating in pure culture**. 2nd ed. Vaduz: J. Cramer, 1974. 315p.

BAE, S. R.; ABRAHIM, T. E. Studies on chromium (VI) Adsorption– desorption using immobilized fungal biomass. **Bioresour. Technol.**, v. 87, p. 17-26, 2003.

BAE, W.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Cell surface display of synthetic phytochelatins using ice nucleation protein for enhanced heavy metal bioaccumulation. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 88, p. 223-227, 2002.

BAE, W.; WU, C. W.; KOSTAL, J.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Enhanced mercury biosorption by bacterial cells with surface-displayed MerR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3176-3180, 2003.

BAE, W.; MEHRA, R. K.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Genetic engineering of *Escherichia coli* for enhanced uptake and bioaccumulation of mercury. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5335-5338, 2001.

BARKAY, T. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. **FEMS Microbiology Review**, v.27, p.355-384, 2003.

BARRON, G. L. **The genera of hyphomycetes from soil**. New York: Robert E. Krieger Publishing, 1972. 364 p.

BIONDO, R.; SILVA, F. A.; VICENTE, E. J.; SARKIS, J. E. S.; SCHENBERG, A. C. G. Synthetic Phytochelatin Surface Display in *Cupriavidus metallidurans* CH34 for Enhanced Metals Bioremediation. **Environ. Sci. Technol.**, v. 46, p. 8325-8332, 2012.

BISHNOI, N. R.; KUMAR, R.; BISHNOI, K. Biosorption of Cr(VI) with *Trichoderma viride* immobilized fungal biomass and cell free Ca-alginate beads. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 45, p. 657-664, 2007.

BISHOP, P. L. **Pollution prevention: fundamentals and practice**. Beijing: Tsinghua University Press, 2002.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BLUMER, S. A. G. **Enriquecimento com ferro em levedura *Saccharomyces cerevisiae***. 2002. Tese (Mestrado) - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimento, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- BRADY, D.; DUNCAN, J. R. Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 149-154, 1994.
- BULJAN, J. Pollution limits for discharge of tannery effluents into water bodies and sewers. **World Leath.**, v. 9, p. 65-68, 1996.
- CAIRNEY, T. **Contaminated land**. London: Blackie, 1993.
- CHEN, C. Removal of heavy metal ions by waste biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Environ. Eng.**, v. 136, n. 1, p. 95-102, 2010.
- COLLA, L. M.; PRIMAZ, L.; LIMA, M.; BERTOLIN, E.; COSTA, L. A. V. Isolation and screening of fungi to bioremediation from triazine herbicide contaminated soil. **Ciênc. Agrotec.**, v. 32, n. 3, p. 809-813, 2008.
- COMBER, S.; GARDNER, M. **J. Environ. Monitor.**, v. 5, p. 410-413, 2003.
- DHANKHAR, P. C.; HOODA, R.; H. P. Nephrotoxic and hepatotoxic effects of a chromium (VI) compound in comparison to a basic chromium (III) tanning agent. **World Leath.**, v. 11, p. 66-70, 2011.
- DOREA, J. G. Mercury in hair and in fish consumed by Riparian women of the Rio Negro, Amazon, Brazil. **International Journal of Environmental Health Research**, v.13, p.239-48, 2003.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - Nanotechnology White Paper. Disponível em: <http://www.epa.gov/OSA/pdfs/EPA_nanotechnology_white_paper_external_review_draft_12-02-2005.pdf>. Acesso em: 09 ago. 2015
- FRANKLIN, R. L. **Determinação de mercúrio total e orgânico e avaliação dos processos de metilação e desmetilação em sedimentos do reservatório Rio Grande, estado de São Paulo**. Tese. (Doutorado) – Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- FRITZGERALD, A. M.; MUDGE, A. M.; GLEAVE, A. P.; PLUMMER, K. M. Agrobacterium and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. **Mycological Research**, v. 107, p. 803-810, 2003.
- GADD, G. M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 84, n. 1, p. 13-28, 2009.
- GADD, G. M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. **Geoderma**, v. 122, p. 109-119, 2004.

GIETZ, R. D.; SUGINO, A. Methods to enhance *S. cerevisiae*. **Gene**. v. 74, p.527-534, 1988.

HAFEZ, N.; ABDEL-RAZEK, A.S.; HAFEZ, M. B. Accumulation of some heavy metals on *Aspergillus flavus*. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 68, p. 19-22, 1997.

HÖLKER, U.; FAKOUSSA, R.; HÖFER, M. Growth substrates control the ability of *Fusarium oxysporum* to solubilize low-rank coal. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 43, p. 351-355, 1995.

HU, H.; JIN, Q.; KAVA, P.A Study of Heavy Metal Pollution in China: Current Status, Pollution-Control Policies and Countermeasures. **Sustainability**, v. 6, p. 5820-5838,2014.

JOSHI, P. K.; SWARUP, A.;MAHESHWAR, S.; KUMAR, R.; SINGH, N. Bioremediation of Heavy Metals in Liquid Media Through Fungi Isolated from Contaminated Sources. **Indian J. Microbiol.**, v. 51, n. 4, p. 482-487, 2011.

JUBERG, D.R.; KLEIMAN, C.F. & KWON, S.C. Position paper of the American council on science and health: lead and human health. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, v. 38, p. 162-180, 1997.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Heavy metal biosorption sites in *Aspergillusniger*. **Biores. Technol.**, v. 61, p. 221-227, 1997.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Fungi biosorption - an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. **Bioresour. Technol.**, v. 53, p. 195-206, 1995.

KAPOOR, A. Fungi as biosorption. In: Wase DAJ, Forster CF, editors. Biosorbents for Metal Ions. London, UK: Taylor & Francis, p. 67-85, 1997.

KOTRBA, P.; DOLEKOVA, L.; LORENZO, V. D.; RUMML, T.Enhanced bioaccumulation of heavy metal ions by bacterial cells due to surface display of short metal binding peptides.**Appl Environ Microbiol.**, v. 65, p. 1092-1098, 1999.

KRAUTER, P.; MARTINELLI, R.; WILLIAMS, K.; MARTINS, S. Removal of Cr(VI)from Ground Water by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biodegradation**, v. 7, p. 277-286, 1996.

LEBRUN, M.; AUDURIER, A.; COSSART, P. Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeriamonocytogenes*are similar to cadA and cadC of *Staphylococcus aureus* and are induced by cadmium. **J Bacteriol.**, v. 176, p. 3040-3048, 1994.

MACEDO, L. S.; MORRIL, W. B. B. Origem e comportamento dos metais fitotóxicos: revisão de literatura. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v. 2, p. 29-38, 2008.

MARTIN, S.; GRISWOLD, W. Human health effects of heavy metals. **Environ. Sci. Technol. Br.**, v. 15, p. 1-6, 2009.

- MEJÁRE, M.; BÜLOW L. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. **Trends in Biotechnology**, v. 19, p. 67-73, 2001.
- MELGAR, M.J.; ALONSO, J.; GARCIA, M. A. Removal of toxic metals from aqueous solutions by fungal biomass of *Agaricus macrospores*. **Science of the Total Environment**, v. 385, p. 12-19, 2007.
- MONACHESE, M.; BURTON, J. P.; REID, G. Bioremediation and Tolerance of Humans to Heavy Metals through Microbial Processes: a Potential Role for Probiotics? **Appl. Environ. Microbiol.**, v.78, p. 397-640, 2012.
- MONEY, C. A. Options for cleaner chromium tanning. *In Clean Technology Challenges, Part 2, XXV IULTCS, India*, p. 27-30, 1999.
- MORLEY, G. F.; GADD, G. M. Sorption of toxic metals by fungi and clay materials. **Mycol. Res.**, v. 99, p.1428-1439, 1998.
- MORTATTI, J.; BERNARDES, M. C.; PROBST, J. L.; LELEYTER-REINERT, L. Composição química dos sedimentos fluviais em suspensão na bacia do rio Piracicaba: extração seletiva de elementos traço. **Geochimica Brasiliensis**, v. 16, n. 2, p. 123-141, 2002.
- NRIAGU, J. O. Mercury pollution in Brazil. **Nature**, v.356, p.389-396, 1992.
- NRIAGU, J. O.; NIEBOER, E. Chromium in the natural and human environments. **Mycol. Res.**, 1988.
- ORLOVICH, D. A.; ASHFORD, A. E. Polyphosphate granules are an artefact of specimen preparation in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Protoplasma**, v. 173, n. 91-102, 1993.
- PAOLETTI, M. G. Using bioindicators based on biodiversity to assess landscape sustainability. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.74, p.1-18, 1999.
- PEINTNER, U.; MOSER, M. Survey of heavy metal deposition at the schulterberg by using basidiomycetes as bioindicators. **Phyton-Annales Rei Botanicae**, v.35, n.4, p.155-162, 1996.
- PEREGO, P.; HOWELL, S. B. Molecular mechanisms controlling sensitivity to toxic metal ions in yeast. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 147, p. 312-8, 1997.
- PETERS, R. W.; YOUNG, K.; BHATTACHARAYAN, D. Evaluation of recent treatment technique for removal of heavy metals from industrial wastewater. **Cell Biochem. Biophys.**, v. 81, p. 1695-1703, 1985.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Fungi and Food Spoilage*. London: Blackie Academic Professional, 2009. 519p.
- PORCELA, D. B. Mercury in the Environment: Biogeochemistry. In: WATRAS, C. J.; HUCKABEE, J. W. (Ed.) *Mercury pollution: integration and synthesis*. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, p.2-7.

PREUSS, H. G.; ECHARD, B.; PERICONE, N. V.; BAGCHD, I.; YASMIN, T.; STOHS, S. J. **J. Inorg. Biochem.**, v. 102, p. 1986-1990, 2008.

QUINA F. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 6, p. 1028-1029, 2004.

RAUSER, W. E. Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins. **Cell Biochem. Biophys.**, v. 31, p. 19-48, 1999.

REGINE, H. S. F.; VOLESKY, B. Biosorption: a solution to pollution. **Int. Microbiol.**, v. 3, p. 17-24, 2000.

RIDDELL, R.W. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. **Mycologia**, v. 42, p. 265-270, 1950.

RIVERA-BECERRIL, F.; CALANTZIS, C.; TURNAU, K.; CAUSSANEL, J. P.; BELIMOV, A.A.; GIANINAZZI, S.; STRASSER, R. J.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1177-1185, 2002.

SADEGHIS.; ZERAATKAR, A.; MOGHADDAM, The procedure to reach accumulation of heavy metals. **Talanta**, v. 99, p. 758-766, 2012.

SCHIESTL, R. H.; GIETZ, R. D. Transformation of yeast. **Curr. Genet.**, v.16, p. 339-346, 1989.

SHOAIB, A.; ASLAM, N.; ASLAM, N. Myco and Phyto Remediation of Heavy Metals from Aqueous Solution. **The Online Journal of Science and Technology**, v. 2, p. 3, 2012.

SHRIVASTAVA, H. Y.; NAIR, B. U. Chromium (III) mediated structural modifications of glycoprotein–Impact of ligand and the oxidants. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 285, p. 915-920, 2001.

SILVA, R. R. Biorremediação de solos contaminados com organoclorados por fungos basidiomicetos em biorreatores, **Quim. Nova**, v. 6, p. 7-15, 2009.

SINHA, A.; KUMAR, S.; KHAR, S. K. Biochemical Basis of Mercury Remediation and Bioaccumulation by *Enterobacter* sp. EMB21. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 169, p. 256-267, 2013.

THIPPESWAMY, B.; SHIVAKUMAR, C. K.; KRISHNAPPA, M. Study on heavy metals biosorption ability of *Saccharomyces cerevisiae*. **Int. Journ. Biol. Research**, v. 2, n. 2, p. 106-115, 2014.

- VALDMAN, E.; LEITE, S. G. F.; Biosorption of Cd, Zn and Cu by *Sargassum* sp. **Waste biomass Bioprocess. Eng.**, v.22, p. 171-173, 2000.
- VEGLIO, F.; BEOLCMI, F. Removal of metals by biosorption: a review. **J Hydrometall.**, v. 74, p. 301–316, 1997.
- VOLESKY, B. Biosorption and biosorbents. **Biosorption of Heavy Metals.** v. 1, p. 3-5, 1990.
- VOLESKY, B.; MAY-PHILLIPS, H. A. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 42, p. 797-806, 1995.
- YAN, G.; VIRARAGHAVAN, T. Effect of pre-treatment on the of heavy metals on *Mucor rouxii*. **Water SA.**, v. 26, p. 119–123, 2000.
- WANG, J. L.; CHEN, C.; Biosorbents for heavy metals removal and their future. **Biotechnol. Adv.**, v. 27, n. 2, 195-226, 2009.
- WANG, L.L.; WANG, J.Q.; ZHENG, Z.X.; XIAO, P. Biosorption of heavy metals. **J. Hazard. Mater.**, v. 177, p. 114-118, 2010.
- ZABEL, T. F. Diffuse sources of pollution by heavy metals. **Journal of the Institution of Water Environmental Management**, v.7, p.513-520, 1993.

APÊNDICE

| ID | Espécie | CIM-Pb | Vcr (CM/DIA) | CIM-Cd | Vcr (CM/DIA) | CIM-Cr | Vcr (CM/DIA) | CIM-Hg | Vcr (CM/DIA) |
|----|------------------------------|------------|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|----------|--------------|
| 1 | Penicillium italicum | 500 mg/L | 0,34 | 125 mg/L | 0,16 | 62 mg/L | 0,4 | 15 mg/L | 0,38 |
| 2 | Aspergillus ustus | 500 mg/L | 0,16 | 125 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0,24 | 15 mg/L | 0,26 |
| 3 | Penicillium citrinum | 500 mg/L | 0,64 | 125 mg/L | 0,06 | 15 mg/L | 0,14 | 31 mg/L | 0,12 |
| 4 | Rhodotorula sloofiae | 250 mg/L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 mg/L | 0,06 |
| 5 | Penicillium italicum | 500 mg/L | 0,28 | 62 mg/L | 0,16 | 31 mg/L | 0,34 | 31 mg/L | 0,36 |
| 6 | Aspergillus versicolor | 250 mg/L | 0,12 | 31 mg/L | 0,04 | 15 mg/L | 0,12 | 15 mg/L | 0,12 |
| 7 | Fusarium graminearum | ≥1000 mg/L | 0,3 | 0 | 0 | 125 mg/L | 0,7 | 62 mg/L | 0,2 |
| 8 | Aspergillus versicolor | ≥1000 mg/L | 0,12 | 0 | 0 | 250 mg/L | 0,52 | 15 mg/L | 0,4 |
| 9 | Aspergillus flavus-oryzae | ≥1000 mg/L | 0,3 | 62 mg/L | 0,04 | 31 mg/L | 0,54 | 31 mg/L | 0,46 |
| 10 | Alternaria tenuissima | ≥250 mg/L | 0,16 | 250 mg/L | 0,1 | 31 mg/L | 0,14 | 0 | 0 |
| 11 | Aspergillus versicolor | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | Trichoderma longibrachiatum | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | Penicillium pinophilum | ≥500 mg/L | 0,24 | 125 mg/L | 0,2 | 15 mg/L | 0,4 | 0 | 0 |
| 14 | Aspergillus versicolor | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | Cladosporium cladosporioides | 250 mg/L | 0,06 | 0 | 0 | 31 mg/L | 0,2 | 0 | 0 |
| 16 | Pleosporales sp. | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | Ascochyta manawaore | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | Penicillium crustosum | ≥500 mg/L | 0,2 | 125 mg/L | 0,04 | 15 mg/L | 0,22 | 31 mg/L | 0,2 |
| 19 | Acremonium strictum | 250 mg/L | 0 | 31 mg/L | 0,2 | 31 mg/L | 0,16 | 0 | 0 |
| 20 | Penicillium citrinum | ≥1000 mg/L | 0,4 | 62 mg/L | 0,3 | ≥500 mg/L | 0,1 | 125 mg/L | 0,3 |
| 21 | Peniophora sp. | ≥1000 mg/L | 0,54 | 125 mg/L | 0,04 | 62 mg/L | 0,6 | 125 mg/L | 0,5 |
| 22 | Penicillium brevicompactum | ≥500 mg/L | 0 | 250 mg/L | 0,08 | 31 mg/L | 0,14 | 15 mg/L | 0,12 |
| 23 | Microsphaeropsis arundinis | ≥1000 mg/L | 0,14 | 250 mg/L | 0,18 | 62 mg/L | 0,3 | 62 mg/L | 0,34 |
| 24 | Beauveria bassiana | ≥1000 mg/L | 0,1 | ≥500 mg/L | 0 | 250 mg/L | 0,04 | 31 mg/L | 0,1 |
| 25 | Aspergillus ustus | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 26 | Microsphaeropsis arundinis | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 27 | Pseudozyma aphidis | ≥1000 mg/L | 0 | ≥500 mg/L | 0,08 | 250 mg/L | 0 | 62 mg/L | 0 |
| 28 | Cladosporium cladosporioides | ≥1000 mg/L | 0,5 | 0 | 0 | ≥500 mg/L | 0,46 | 125 mg/L | 0,5 |
| 29 | Aspergillus flavus | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 30 | Phialophora sp. | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 31 | Cladosporium cladosporioides | ≥1000 mg/L | 0 | 0 | 0 | 125 mg/L | 0,14 | 31 mg/L | 0,04 |
| 32 | Penicillium sp. | ≥500 mg/L | 0,26 | 125 mg/L | 0,16 | 62 mg/L | 0,3 | 15 mg/L | 0,12 |
| 33 | Cryptococcus laurentii | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 34 | Aspergillus sp. | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 35 | Aspergillus sp. | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 36 | Cladosporium cladosporioides | ≥1000 mg/L | 0 | ≥500 mg/L | 0,06 | ≥500 mg/L | 0,2 | 62 mg/L | 0,16 |
| 37 | Alternaria alternata | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 38 | Westerdykella purpurea | ≥1000 mg/L | 0,2 | 125 mg/L | 0,14 | 62 mg/L | 0,2 | 62 mg/L | 0,3 |
| 39 | Bipolaris papendorfii | 500 mg/L | 0,38 | 125 mg/L | 0,34 | 31 mg/L | 0,5 | 15 mg/L | 0,6 |
| 40 | Penicillium sp. | ≥500 mg/L | 0,2 | 31 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0,3 | 15 mg/L | 0,22 |
| 41 | Leptosphaeria sp. | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 42 | Aspergillus sp. | ≥1000 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0,3 | 62 mg/L | 0,24 | 15 mg/L | 0,32 |
| 43 | FNE | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | | | | |
|----|-----------------------------|------------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|
| 44 | Trichoderma asperellum | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 45 | Penicillium roqueforti | ≥500 mg/L | 0,2 | 62 mg/L | 0 | 62 mg/L | 0,24 | 31 mg/L | 0,2 |
| 46 | Trichoderma longibrachiatum | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 47 | Penicillium sp | ≥500 mg/L | 0,2 | 31 mg/L | 0,14 | 62 mg/L | 0,3 | 31 mg/L | 0,36 |
| 48 | Trichoderma longibrachiatum | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 49 | Rhodotorula mucilaginosa | ≥500 mg/L | 0,02 | 250 mg/L | 0,02 | 31 mg/L | 0,06 | 62 mg/L | 0,02 |
| 50 | Acremonium sp. | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 51 | Cryptococcus laurentii | 250 mg/L | 0,02 | 0 | 0 | 62 mg/L | 0,04 | 31 mg/L | 0,06 |
| 52 | Trichosporon sp. | ≥1000 mg/L | 0,1 | 31 | 0,9 | 31 mg/L | 0,2 | 31 mg/L | 0,24 |
| 53 | Penicillium funiculosum | 500 mg/L | 0,3 | 31 mg/L | 0,32 | 125 mg/L | 0,3 | 62 mg/L | 0,14 |
| 54 | Aspergillus sp. | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 55 | Penicillium pinophilum | ≥1000 mg/L | 0,28 | 250 mg/L | 0,2 | 62 mg/L | 0,3 | 62 mg/L | 0,3 |
| 56 | Penicillium roquefortii | 500 mg/L | 0,34 | 31 mg/L | 0,22 | 62 mg/L | 0,24 | 62 mg/L | 0,26 |
| 57 | Penicillium citrinum | ≥1000 mg/L | 0,14 | 125 mg/L | 0,08 | 15 mg/L | 0,14 | 0 | 0 |
| 58 | Penicillium sp. | 500 mg/L | 0,26 | 31 mg/L | 0,28 | 62 mg/L | 0,24 | 62 mg/L | 0,32 |
| 59 | Penicillium | 500 mg/L | 0,14 | 31 mg/L | 0,18 | 31 mg/L | 0,22 | 0 | 0 |
| 60 | Penicillium citrinum | ≥1000 mg/L | 0,28 | 125 mg/L | 0,08 | 31 mg/L | 0,22 | 0 | 0 |
| 61 | Talaromyces stollii | 500 mg/L | 0,28 | 62 mg/L | 0,22 | 125 mg/L | 0,3 | 62 mg/L | 0,3 |
| 62 | Talaromyces barcinensis | 250 mg/L | 0,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 63 | Penicillium italicum | ≥1000 mg/L | 0,4 | 0 | 0 | ≥500 mg/L | 0,1 | 125 mg/L | 0,46 |
| 64 | Penicillium funiculosum | 500 mg/L | 0,3 | 62 mg/L | 0,18 | 125 mg/L | 0,22 | 62 mg/L | 0,32 |
| 65 | Curvularia affinis | ≥1000 mg/L | 0,2 | ≥500 mg/L | 0,16 | 62 mg/L | 0,2 | 31 mg/L | 0,18 |
| 66 | Aspergillus restrictus | 500 mg/L | 0 | 250 mg/L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 67 | Penicillium | ≥1000 mg/L | 0,16 | 31 mg/L | 0,04 | 31 mg/L | 0,26 | 0 | 0 |
| 68 | Penicillium | 250 mg/L | 0,16 | 62 mg/L | 0,04 | 62 mg/L | 0,32 | 15 mg/L | 0,26 |
| 69 | Westerdykella purpúrea | ≥1000 mg/L | 0,06 | 0 | 0 | 62 mg/L | 0,2 | 0 | 0 |
| 70 | Emercellopsis sp | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 71 | Penicillium commune | ≥1000 mg/L | 0,14 | 62 mg/L | 0,06 | 15 mg/L | 0,2 | 0 | 0 |
| 72 | Trichoderma atroviride | ≥1000 mg/L | 0 | ≥500 mg/L | 0,5 | 250 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0,04 |
| 73 | Trichosporon chiarelli | ≥1000 mg/L | 0,08 | 31 mg/L | -0,9 | 15 mg/L | 0,38 | 15 mg/L | 0,32 |
| 74 | Rhodotorula mucilaginosa | ≥1000 mg/L | 0 | ≥500 mg/L | 0 | 31 mg/L | 0,04 | 31 mg/L | 0,02 |
| 75 | levedura | 500 mg/L | 0,02 | 250 mg/L | 0,02 | 250 mg/L | 0 | 31 mg/L | 0,04 |
| 76 | levedura | 500 mg/L | 0 | 250 mg/L | 0 | 62 mg/L | 0 | 31 mg/L | 0,04 |
| 77 | Geotrichium sp. | ≥1000 mg/L | 0 | ≥500 mg/L | 0,2 | 250 mg/L | 0 | 62 mg/L | 0 |
| 78 | FNE | ≥1000 mg/L | 0,2 | ≥500 mg/L | 0,24 | 250 mg/L | 0 | 62 mg/L | 0 |
| 79 | Penicillium sp. | ≥1000 mg/L | 0,12 | 125 mg/L | 0,12 | 15 mg/L | 0,22 | 0 | 0 |
| 80 | Penicillium sp | ≥1000 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0,08 | 15 mg/L | 0,2 | 0 | 0 |
| 81 | FNE | 500 mg/L | 0 | 31 mg/L | 0 | 0 | 0 | 31 mg/L | 0 |
| 82 | levedura | ≥1000 mg/L | 0,02 | 0 | 0 | 125 mg/L | 0,1 | 125 mg/L | 0,1 |
| 83 | Trichoderma sp. | ≥1000 mg/L | 1,3 | ≥500 mg/L | 0,5 | ≥500 mg/L | 1,3 | ≥250 mg/L | 1,3 |
| 84 | Penicillium | 500 mg/L | 0,14 | ≥500 mg/L | 0,12 | 62 mg/L | 0,32 | 15 mg/L | 0,3 |
| 85 | Trichoderma atroviride | ≥1000 mg/L | 0,1 | ≥500 mg/L | 0 | 250 mg/L | 0,3 | 62 mg/L | 0 |
| 86 | levedura | ≥1000 mg/L | 0 | 62 mg/L | 0 | 125 mg/L | 0 | 62 mg/L | 0 |
| 87 | Penicillium funiculosum | ≥1000 mg/L | 0,18 | 62 mg/L | 0,12 | 62 mg/L | 0,26 | 15 mg/L | 0,18 |
| 88 | Issatchenkia orientalis | ≥1000 mg/L | 0,04 | 125 mg/L | 0 | 31 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0,1 |
| 89 | Penicillium raistrickii | 500 mg/L | 0,14 | 62 mg/L | 0,06 | 15 mg/L | 0,24 | 0 | 0 |

| | | | | | | | | | |
|-----|-------------------------------------|------------|------|-----------|------|-----------|------|----------|------|
| 90 | <i>Trichosporon chiarelli</i> | ≥1000 mg/L | 0,14 | 250 mg/L | 0 | 250 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0,14 |
| 91 | <i>Rhodotorula</i> | ≥1000 mg/L | 0 | 250 mg/L | 0 | 31 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0 |
| 92 | FNE | ≥1000 mg/L | 0 | 62 mg/L | 0,04 | 62 mg/L | 0,08 | 62 mg/L | 0,04 |
| 93 | <i>Penicillium</i> | ≥1000 mg/L | 0,38 | 31 mg/L | 0,06 | 31 mg/L | 0,06 | 0 | 0 |
| 94 | FNE | ≥1000 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0 | 250 mg/L | 0,18 | 125 mg/L | 0,26 |
| 95 | <i>Rhodotorula</i> | ≥1000 mg/L | 0 | 62 mg/L | 0 | 15 mg/L | 0 | 62 mg/L | 0 |
| 96 | <i>Massariosphaeria sp.</i> | ≥1000 mg/L | 0,06 | 62 mg/L | 0 | 62 mg/L | 0,08 | 15 mg/L | 0 |
| 97 | FNE | ≥1000 mg/L | 0,22 | 62 mg/L | 0,02 | 15 mg/L | 0,34 | 15 mg/L | 0,38 |
| 98 | FNE | ≥1000 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0,14 | 125 mg/L | 0,54 | 62 mg/L | 0,4 |
| 99 | FNE | ≥1000 mg/L | 0,44 | 31 mg/L | 0,14 | 62 mg/L | 0,5 | 62 mg/L | 0,3 |
| 100 | <i>Penicillium pinophilum</i> | ≥1000 mg/L | 0,14 | 125 mg/L | 0,08 | 15 mg/L | 0,26 | 0 | 0 |
| 101 | <i>Microsphaeropsis arundinis</i> | ≥1000 mg/L | 0,24 | 250 mg/L | 0,08 | 62 mg/L | 0,3 | 62 mg/L | 0,24 |
| 102 | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | ≥1000 mg/L | 0,06 | 0 | 0 | 15 mg/L | 0,22 | 62 mg/L | 0,24 |
| 103 | <i>Plectosphaerella cucumerina</i> | ≥1000 mg/L | 0,16 | 250 mg/L | 0,04 | 62 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0,1 |
| 104 | <i>Capnodium sp.</i> | ≥1000 mg/L | 0,06 | 62 mg/L | 0,08 | 31 mg/L | 0,18 | 62 mg/L | 0 |
| 105 | FNE | 250 mg/L | 0,1 | 0 | 0 | 62 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0,1 |
| 106 | <i>Ascochyta manawaore</i> | 500 mg/L | 0,1 | 0 | 0 | 125 mg/L | 0,24 | 0 | 0 |
| 107 | FNE | ≥1000 mg/L | 0,1 | 250 mg/L | 0 | 31 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0,1 |
| 108 | <i>Rhodotorula ingeniosa</i> | 500 mg/L | 0,04 | 250 mg/L | 0 | 31 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0,06 |
| 109 | <i>Cerebella andropogonis</i> | ≥1000 mg/L | 0,18 | 31 mg/L | 0,2 | 31 mg/L | 0,2 | 31 mg/L | 0,2 |
| 110 | FNE | ≥1000 mg/L | 0,1 | 250 mg/L | 0,18 | 62 mg/L | 0,48 | 15 mg/L | 0 |
| 111 | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | ≥1000 mg/L | 0,06 | 0 | 0 | 31 mg/L | 0,1 | 31 mg/L | 0,1 |
| 112 | <i>Penicillium raistrickii</i> | ≥1000 mg/L | 0,18 | 62 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0,28 | 31 mg/L | 0,22 |
| 113 | <i>Curvularia affinis</i> | ≥1000 mg/L | 0,4 | ≥500 mg/L | 0,08 | 250 mg/L | 1,3 | 62 mg/L | 0,34 |
| 114 | FNE | ≥1000 mg/L | 0,06 | 31 mg/L | 0,02 | 15 mg/L | 0,3 | 15 mg/L | 0,32 |
| 115 | <i>Penicillium raistrickii</i> | ≥1000 mg/L | 0,18 | 62 mg/L | 0,12 | 62 mg/L | 0,22 | 31 mg/L | 0,24 |
| 116 | <i>Metarhizium anisopliae</i> | ≥1000 mg/L | 0,24 | ≥500 mg/L | 0 | 250 mg/L | 0,1 | 125 mg/L | 0,14 |
| 117 | <i>Cladosporium langeronii</i> | 500 mg/L | 0,08 | 0 | 0 | 15 mg/L | 0,06 | 62 mg/L | 0,06 |
| 118 | FNE | ≥1000 mg/L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 31 mg/L | 0,2 |
| 119 | FNE | ≥1000 mg/L | 0,18 | ≥500 mg/L | 0 | 62 mg/L | 0,14 | 62 mg/L | 0,14 |
| 120 | <i>Penicillium commune</i> | ≥1000 mg/L | 0,24 | ≥500 mg/L | 0,2 | 125 mg/L | 0,24 | 62 mg/L | 0,2 |
| 121 | <i>Metarhizium anisopliae</i> | ≥1000 mg/L | 0,1 | 250 mg/L | 0,1 | 125 | 0,28 | 125 mg/L | 0,18 |
| 122 | FNE | 500 mg/L | 0,28 | 0 | 0 | 62 mg/L | 0,4 | 62 mg/L | 0,3 |
| 123 | FNE | ≥1000 mg/L | 0,2 | ≥500 mg/L | 0 | 62 mg/L | 0,12 | 62 mg/L | 0,1 |
| 124 | <i>Cryptococcus laurentii</i> | ≥1000 mg/L | 0,1 | 31 mg/L | 0 | 31 mg/L | 0 | 125 mg/L | 0,08 |
| 125 | FNE | ≥1000 mg/L | 0,4 | 62 mg/L | 0,1 | 250 mg/L | 0,3 | 125 mg/L | 0,22 |
| 126 | <i>Hormonema sp.</i> | 250 mg/L | 0,02 | 0 | 0 | 62 mg/L | 0,06 | 62 mg/L | 0,06 |
| 127 | FNE | 500 mg/L | 0,04 | 62 mg/L | 0,02 | 15 mg/L | 0,3 | 15 mg/L | 0,32 |
| 128 | <i>Cryptococcus laurentii</i> | ≥1000 mg/L | 0 | 62 mg/L | 0,1 | 125 mg/L | -0,8 | 125 mg/L | 0,04 |
| 129 | FNE | 125 mg/L | 0,1 | 31 mg/L | 0,08 | 62 mg/L | 0,1 | 0 | 0 |
| 130 | FNE | ≥1000 mg/L | 0,3 | 250 mg/L | 0,1 | ≥500 mg/L | 0,2 | 125 mg/L | 0,1 |
| 131 | <i>Metarhizium anisopliae</i> | ≥1000 mg/L | 0 | 250 mg/L | 0,02 | ≥500 mg/L | 0,2 | 125 mg/L | 0,08 |
| 132 | <i>Rhodotorula glutinis</i> | ≥1000 mg/L | 0 | 250 mg/L | 0 | 62 mg/L | 0 | 62 mg/L | 0 |
| 133 | <i>Evlachovaea sp.</i> | ≥1000 mg/L | 0,2 | ≥500 mg/L | 0,1 | 125 mg/L | 0,2 | 125 mg/L | 0,06 |
| 134 | FNE | ≥1000 mg/L | 0,14 | 62 mg/L | 0,2 | 62 mg/L | 0,1 | 31 mg/L | 0,2 |
| 135 | <i>Beauveria bassiana</i> | ≥1000 mg/L | 0,14 | ≥500 mg/L | 0,06 | ≥500 mg/L | 0,2 | 125 mg/L | 0,1 |

| | | | | | | | | | |
|-----|------------------------------|------------|------|-----------|------|-----------|------|----------|------|
| 136 | Fusarium sp. | 500 mg/L | 0,14 | 250 mg/L | 0,2 | 125 mg/L | 0,5 | 125 mg/L | 0,3 |
| 137 | FNE | ≥1000 mg/L | 0,1 | ≥500 mg/L | 0,02 | 250 mg/L | 0,1 | 125 mg/L | 0,1 |
| 138 | Acremonium sp. | ≥1000 mg/L | 0,3 | ≥500 mg/L | 0,14 | 125 mg/L | 0,24 | 125 mg/L | 0,3 |
| 139 | Galactomyces geotrichum | ≥1000 mg/L | 0,3 | 125 mg/L | 0,1 | 250 mg/L | 0,2 | 125 mg/L | 0,4 |
| 140 | Penicillium sp. | ≥1000 mg/L | 0,26 | 125 mg/L | 0,14 | 250 mg/L | 0,2 | 125 mg/L | 0,3 |
| 141 | Exophiala phaeomuriformis | ≥1000 mg/L | 0,26 | ≥500 mg/L | 0,1 | 250 mg/L | 0,2 | 62 mg/L | 0,2 |
| 142 | Cladosporium cladosporioides | ≥1000 mg/L | 0 | 62 mg/L | 0 | 125 mg/L | 0,1 | 125 mg/L | 0,1 |
| 143 | Trichoderma harzianum | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 144 | Rhodotorula mucilaginosa | 500 mg/L | 0 | 125 mg/L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 145 | Candida tropicalis | 500 mg/L | 0,06 | 125 mg/L | 0 | ≥500 mg/L | 0 | 31 mg/L | 0 |
| 146 | Aspergillus clavatus | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 147 | Penicillium sp. | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 31 mg/L | 0,04 | 0 | 0 |
| 148 | Massariosphaeria sp. | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 149 | Issatchenkia orientalis | ≥1000 mg/L | 0 | 125 mg/L | 0,04 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 150 | Trichoderma atroviride | ≥1000 mg/L | 0,6 | ≥500 mg/L | 0,6 | ≥500 mg/L | 0,7 | 125 mg/L | 0 |
| 151 | Penicillium | 500 mg/L | 0,4 | ≥500 mg/L | 0,36 | 125 mg/L | 0,38 | 62 mg/L | 0,24 |
| 152 | Pichia occidentalis | ≥1000 mg/L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 31 mg/L | 0,02 |
| 153 | Rhodotorula mucilaginosa | ≥1000 mg/L | 0 | ≥500 mg/L | 0 | 0 | 0 | 15 mg/L | 0 |
| 154 | Aspergillus versicolor | ≥1000 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0,02 | 31 mg/L | 0,44 | 15 mg/L | 0,4 |
| 155 | Lecytophora hofmani | ≥1000 mg/L | 0,06 | ≥500 mg/L | 0,14 | 62 mg/L | 0,2 | 15 mg/L | 0,26 |
| 156 | Talaromyces sp. | 500 mg/L | 0,16 | 125 mg/L | 0,14 | 250 mg/L | 0,2 | 0 | 0 |
| 157 | Fusarium verticillioides | ≥1000 mg/L | 0,5 | ≥500 mg/L | 0,5 | ≥500 mg/L | 0,5 | 0 | 0 |
| 158 | FNE | ≥1000 mg/L | 0 | 125 mg/L | 0 | ≥500 mg/L | 0 | 62 mg/L | 0 |
| 159 | Penicillium sp. | ≥1000 mg/L | 0,16 | 125 mg/L | 0,08 | 31 mg/L | 0,14 | 31 mg/L | 0,14 |
| 160 | FNE | ≥1000 mg/L | 0,54 | ≥500 mg/L | 0,06 | 125 mg/L | 0,44 | 62 mg/L | 0,34 |
| 161 | Pichia fermentans | 250 mg/L | 0 | 125 mg/L | 0 | 250 mg/L | 0 | 31 mg/L | 0 |
| 162 | Capnodium sp. | ≥1000 mg/L | 0,08 | ≥500 mg/L | 0,06 | 125 mg/L | 0,16 | 62 mg/L | 0,08 |
| 163 | Pichia kudriavzevii | ≥1000 mg/L | 0,2 | ≥500 mg/L | 0,12 | 125 mg/L | 0,3 | 62 mg/L | 0,2 |
| 164 | Thichoderma harzianum | ≥1000 mg/L | 0,34 | ≥500 mg/L | 0,1 | 125 mg/L | 0,34 | 31 mg/L | 0,2 |
| 165 | Penicillium chrysogenum | ≥1000 mg/L | 0,2 | ≥500 mg/L | 0,14 | 31 mg/L | 0,26 | 62 mg/L | 0,22 |
| 166 | Cladosporium cladosporioides | ≥1000 mg/L | 0,06 | 0 | 0 | 250 mg/L | 0,1 | 31 mg/L | 0,1 |
| 167 | Metarhizium anisopliae | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 168 | Rhodotorula mucilaginosa | ≥1000 mg/L | 0 | 250 mg/L | 0 | 62 mg/L | 0 | 62 mg/L | 0 |
| 169 | Fusarium oxysporum | ≥1000 mg/L | 0,48 | 62 mg/L | 0 | 62 mg/L | 0,5 | 0 | 0 |
| 170 | Stagonospora sp. | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 171 | Rhodotorula glutinis | ≥1000 mg/L | 0,04 | 250 mg/L | 0 | 0 | 0 | 31 mg/L | 0,16 |
| 172 | FNE | 250 mg/L | 0,1 | 0 | 0 | 62 mg/L | 0,1 | 31 mg/L | 0,1 |
| 173 | Trichoderma hamatum | ≥1000 mg/L | 0,7 | ≥500 mg/L | 0,2 | ≥500 mg/L | 0,7 | 62 mg/L | 0,7 |
| 174 | FNE | ≥1000 mg/L | 0,3 | 125 mg/L | 0,32 | ≥500 mg/L | 0,5 | 62 mg/L | 0,7 |
| 175 | Beauveria bassiana | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 176 | Alternaria tenuissima | ≥1000 mg/L | 0,26 | 250 mg/L | 0,04 | 250 mg/L | 0,2 | 62 mg/L | 0,2 |
| 177 | Cladosporium langeronii | ≥1000 mg/L | 0,1 | 250 mg/L | 0,04 | 250 mg/L | 0,3 | 31 mg/L | 0,3 |
| 178 | Exophiala phaeomuriformis | ≥1000 mg/L | 0,28 | 125 mg/L | 0,04 | 250 mg/L | 0,4 | 31 mg/L | 0,3 |
| 179 | Evlachovaea sp. | ≥1000 mg/L | 0,1 | 250 mg/L | 0,04 | 250 mg/L | 0,1 | 125 mg/L | 0,18 |
| 180 | Metarhizium anisopliae | 500 mg/L | 0,04 | 250 mg/L | 0,04 | 250 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0,04 |
| 181 | Fusarium oxysporum | ≥1000 mg/L | 0,5 | 250 mg/L | 0,4 | 250 mg/L | 0,5 | 125 mg/L | 0,5 |

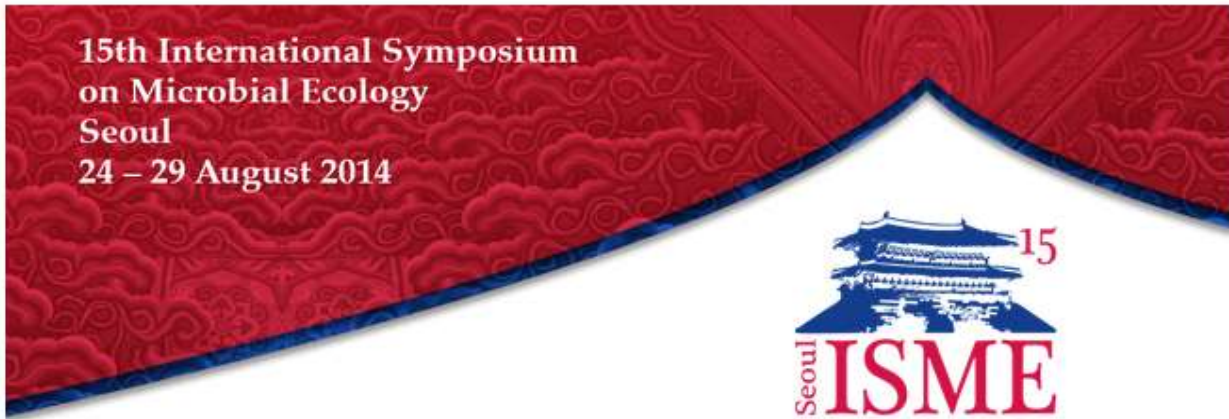
| | | | | | | | | | |
|-----|------------------------------|------------|------|-----------|------|-----------|------|----------|------|
| 182 | Massariosphaeria sp. | ≥1000 mg/L | 0,04 | ≥500 mg/L | 0 | 250 mg/L | 0,04 | 125 mg/L | 0 |
| 183 | Penicillium sp. | ≥1000 mg/L | 0,04 | 250 mg/L | 0,1 | 250 mg/L | 0,16 | 125 mg/L | 0,04 |
| 184 | Trichoderma harzianum | ≥1000 mg/L | 0,9 | ≥500 mg/L | 0,7 | 125 mg/L | 1,3 | 62 mg/L | 0,9 |
| 185 | Trichoderma longibrachiatum | ≥1000 mg/L | 0,7 | 250 mg/L | 0,4 | ≥500 mg/L | 0,7 | 125 mg/L | 0,7 |
| 186 | Lecytophora hoffmannii | ≥1000 mg/L | 0,1 | 250 mg/L | 0,06 | 250 mg/L | 0,1 | 125 mg/L | 0,1 |
| 187 | Penicillium sp. | ≥1000 mg/L | 0,12 | ≥500 mg/L | 0,12 | 62 mg/L | 0,24 | 15 mg/L | 0,1 |
| 188 | Trichoderma hamatum | ≥1000 mg/L | 0,7 | ≥500 mg/L | 0,5 | ≥500 mg/L | 0,64 | 31 mg/L | 0,7 |
| 189 | Lecytophora hoffmannii | ≥1000 mg/L | 0,04 | ≥500 mg/L | 0 | 0 | 0 | 31 mg/L | 0,1 |
| 190 | Microsphaeropsis arundinis | ≥1000 mg/L | 0,4 | 250 mg/L | 0,3 | 0 | 0 | 31 mg/L | 0,24 |
| 191 | Massariosphaeria sp. | ≥1000 mg/L | 0,04 | 250 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0,16 | 15 mg/L | 0,08 |
| 192 | Penicillium citrinum | ≥1000 mg/L | 0,08 | ≥500 mg/L | 0,06 | 15 mg/L | 0,12 | 62 mg/L | 0,06 |
| 193 | Hormonema sp. | ≥1000 mg/L | 0,1 | 250 mg/L | 0,1 | 0 | 0 | 31 mg/L | 0,08 |
| 194 | Phoma pratorum | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 195 | Penicillium griseofulvum | ≥1000 mg/L | 0,04 | 250 mg/L | 0,08 | 62 mg/L | 0,18 | 62 mg/L | 0,12 |
| 196 | Trichoderma harzianum | ≥1000 mg/L | 0,7 | ≥500 mg/L | 0,7 | 250 mg/L | 0,46 | 0 | 0 |
| 197 | Geotrichum sp. | ≥1000 mg/L | 0,04 | 250 mg/L | 0,1 | 0 | 0 | 31 mg/L | 0,16 |
| 198 | Rhodotorula mucilaginosa | ≥1000 mg/L | 0,04 | 250 mg/L | 0,1 | 0 | 0 | 31 mg/L | 0,16 |
| 199 | Penicillium citrinum | ≥1000 mg/L | 0,12 | ≥500 mg/L | 0,14 | 62 mg/L | 0,18 | 62 mg/L | 0,14 |
| 200 | Geotrichum sp. | ≥1000 mg/L | 0,04 | 250 mg/L | 0,1 | 0 | 0 | 31 mg/L | 0,16 |
| 201 | Trichoderma harzianum | ≥1000 mg/L | 0,8 | ≥500 mg/L | 0,7 | 250 mg/L | 0,7 | 0 | 0 |
| 202 | Trichoderma harzianum | ≥1000 mg/L | 1 | ≥500 mg/L | 0,7 | 125 mg/L | 1,2 | 0 | 0 |
| 203 | FNE | ≥1000 mg/L | 0,28 | 250 mg/L | 0,24 | 62 mg/L | 0,3 | 31 mg/L | 0,3 |
| 204 | Trichoderma longibrachiatum | 500 mg/L | 1 | ≥500 mg/L | 0,3 | 250 mg/L | 1,2 | 0 | 0 |
| 205 | Penicillium citrinum | ≥1000 mg/L | 0,12 | ≥500 mg/L | 0,08 | 62 mg/L | 0,12 | 62 mg/L | 0,1 |
| 206 | Trichoderma citrinoviride | ≥1000 mg/L | 0,5 | ≥500 mg/L | 0,26 | ≥500 mg/L | 0,6 | 31 mg/L | 0,4 |
| 207 | Fusarium oxysporum | 500 mg/L | 0,5 | 62 mg/L | 0,3 | 62 mg/L | 0,44 | 31 mg/L | 0,4 |
| 208 | Debaryomyces hansenii | 250 mg/L | 0 | 0 | 0 | 62 mg/L | 0,44 | 0 | 0 |
| 209 | Penicillium citrinum | ≥1000 mg/L | 0,14 | ≥500 mg/L | 0,08 | 62 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0,1 |
| 210 | Lecytophora sp. | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 211 | Penicillium sp. | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 212 | Candida orthopsilosis | ≥1000 mg/L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 213 | Rhodotorula mucilaginosa | 250 mg/L | 0,02 | 62 mg/L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 214 | Candida tropicalis | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 215 | Trichoderma sp. | ≥1000 mg/L | 0,42 | ≥500 mg/L | 0,26 | 250 mg/L | 0,4 | 0 | 0 |
| 216 | FNE | ≥1000 mg/L | 0,1 | ≥500 mg/L | 0,1 | 125 mg/L | 0,4 | 62 mg/L | 0,4 |
| 217 | Rhodotorula minuta | 500 mg/L | 0 | 250 mg/L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 218 | Aspergillus | 500 mg/L | 0,24 | ≥500 mg/L | 0,1 | 31 mg/L | 0,14 | 62 mg/L | 0,14 |
| 219 | Aspergillus | 500 mg/L | 0,04 | 62 mg/L | 0,04 | 62 mg/L | 0,1 | 15 mg/L | 0,06 |
| 220 | Penicillium | ≥1000 mg/L | 0,12 | ≥500 mg/L | 0,06 | 62 mg/L | 0,12 | 62 mg/L | 0,1 |
| 221 | FNE | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 222 | Chlorella sorokiniana (alga) | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 223 | Candida sojae | ≥1000 mg/L | 0 | 250 mg/L | 0 | 250 mg/L | 0 | 0 | 0 |
| 224 | Phialemonium curvatum | ≥1000 mg/L | 0,1 | ≥500 mg/L | 0,06 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 225 | Aspergillus flavus | ≥1000 mg/L | 0,3 | 125 mg/L | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 226 | Trichoderma asperellum | ≥1000 mg/L | 0,74 | ≥500 mg/L | 0,56 | 250 mg/L | 0,32 | 0 | 0 |
| 227 | Trichoderma atroviride | ≥1000 mg/L | 0,5 | ≥500 mg/L | 0,7 | ≥500 mg/L | 0,7 | 0 | 0 |

| | | | | | | | | | |
|-----|-----------------------------------|------------|------|-----------|------|-----------|------|----------|-------|
| 228 | Lophiostoma sp. | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 229 | Cerebella andropogonis | ≥1000 mg/L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 230 | FNE | ≥1000 mg/L | 0,3 | ≥500 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0,34 | 0 | 0 |
| 231 | Talaromyces trachyspermus | 500 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0,1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 232 | Fusarium verticillioides | ≥1000 mg/L | 0,1 | ≥500 mg/L | 0,1 | 250 mg/L | 0,08 | 0 | 0 |
| 233 | Phoma sp. | 500 mg/L | 0,04 | 62 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0,04 | 31 mg/L | 0,3 |
| 234 | Trichoderma asperellum | ≥1000 mg/L | 0,68 | ≥500 mg/L | 0,4 | 250 mg/L | 0,14 | 0 | 0 |
| 235 | Acremonium atrogriseum | 250 mg/L | 0,04 | 250 mg/L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 236 | Trichoderma viride | ≥1000 mg/L | 0,46 | ≥500 mg/L | 0,28 | 250 mg/L | 0,16 | 0 | 0 |
| 237 | Candida quercitrusa | ≥1000 mg/L | 0 | 62 mg/L | 0,1 | 125 mg/L | 0,02 | 0 | 0 |
| 238 | Trichosporon laibachii | ≥1000 mg/L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 31 mg/L | 0,2 |
| 239 | Trichoderma harzianum | ≥1000 mg/L | 0,6 | ≥500 mg/L | 0,6 | ≥500 mg/L | 0,6 | 31 mg/L | 0,6 |
| 240 | Parastagonospora nodorum | 250 mg/L | 0,04 | 250 mg/L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 241 | Fusarium oxysporum f. cubense | ≥1000 mg/L | 0,46 | ≥500 mg/L | 0,36 | 62 mg/L | 0,5 | 125 mg/L | 0,2 |
| 242 | Fusarium oxysporum f. sp. ciceris | ≥1000 mg/L | 0,36 | ≥500 mg/L | 0,3 | 125 mg/L | 0,7 | 125 mg/L | 0,3 |
| 243 | Wickerhamomyces anomalus | ≥1000 mg/L | 0 | 250 mg/L | 0 | ≥500 mg/L | 0 | 0 | 0 |
| 244 | Pichia kluyveri | 500 mg/L | 0,02 | 125 mg/L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 245 | Pichia fermentans | ≥1000 mg/L | 0,5 | ≥500 mg/L | 0,2 | ≥500 mg/L | 0,7 | 125 mg/L | 0,5 |
| 246 | Lecytophora decumbens | ≥1000 mg/L | 0,3 | ≥500 mg/L | 0,2 | 250 mg/L | 0,3 | 31 mg/L | 0,26 |
| 247 | Fusarium solani | ≥1000 mg/L | 0,34 | 125 mg/L | 0,06 | 250 mg/L | 0,4 | 62 mg/L | 0,2 |
| 248 | Fusarium equiseti | ≥1000 mg/L | 0,04 | 0 | 0 | 250 mg/L | 0,22 | 0 | 0 |
| 249 | Epicoccum sorghinum | ≥1000 mg/L | 0,1 | ≥500 mg/L | 0 | 250 mg/L | 0,1 | 0,5 | -0,16 |
| 250 | Cladosporium perangustus | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 251 | Westerdykella purpurea | ≥1000 mg/L | 0,2 | ≥500 mg/L | 0,26 | ≥500 mg/L | 0,2 | 125 mg/L | 0,4 |
| 252 | Fusarium oxysporum | ≥1000 mg/L | 0,3 | 125 mg/L | 0,02 | 250 mg/L | 0,5 | 62 mg/L | 0,3 |
| 253 | Penicillium sp | ≥1000 mg/L | 0,1 | 250 mg/L | 0,02 | 62 mg/L | 0,08 | 15 mg/L | 0,08 |
| 254 | Phaeosphaeria sp. | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 255 | Epicoccum nigrum | 500 mg/L | 0,06 | 0 | 0 | 0 | 0 | 31 mg/L | 0,2 |
| 256 | Phoma herbarum | ≥1000 mg/L | 0,54 | 62 mg/L | 0,1 | ≥500 mg/L | 0,34 | 125 mg/L | 0,26 |
| 257 | Pichia kluyveri | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 258 | Microsphaeropsis arundinis | ≥1000 mg/L | 0,4 | 250 mg/L | 0,3 | ≥500 mg/L | 0,7 | 62 mg/L | 0,3 |
| 259 | Fusarium oxysporum f. cubense | ≥1000 mg/L | 0,2 | 62 mg/L | 0,02 | 125 mg/L | 0,3 | 125 mg/L | 0,2 |
| 260 | Dothideomycetes sp. | ≥1000 mg/L | 0,1 | ≥500 mg/L | 0,2 | ≥500 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0,1 |
| 261 | Aspergillus sydowii | ≥1000 mg/L | 0,04 | 250 mg/L | 0,08 | 62 mg/L | 0,18 | 15 mg/L | 0,12 |
| 262 | Lecytophora decumbens | ≥1000 mg/L | 0,4 | ≥500 mg/L | 0,64 | ≥500 mg/L | 0,4 | 125 mg/L | 0,7 |
| 263 | Cladosporium cladosporioides | ≥1000 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0 | 125 mg/L | 0,2 | 62 mg/L | 0,14 |
| 264 | Epicoccum sorghi | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 265 | Pichia kluyveri | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 266 | Trichoderma atroviride | ≥1000 mg/L | 0,7 | ≥500 mg/L | 0,2 | ≥500 mg/L | 0,4 | 125 mg/L | 0,7 |
| 267 | Microdochium bollevy | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 268 | Rhodotorula minuta | ≥1000 mg/L | 0,04 | 0 | 0 | 0 | 0 | 62 mg/L | 0,02 |
| 269 | Penicillium citreonigrum | ≥1000 mg/L | 0,7 | ≥500 mg/L | 0,44 | ≥500 mg/L | 0,4 | 125 mg/L | 0,6 |
| 270 | Fusarium oxysporum f. cubense | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 271 | Cladosporium cladosporioides | ≥1000 mg/L | 0,2 | ≥500 mg/L | 0,1 | 125 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0,1 |
| 272 | FNE | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 273 | Fusarium solani | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | | | | |
|-----|-------------------------------|------------|------|-----------|-------|-----------|------|-----------|------|
| 274 | Cladosporium cladosporioides | ≥1000 mg/L | 0,18 | ≥500 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0,14 | 62 mg/L | 0,1 |
| 275 | Microsphaeropsis arundinis | ≥1000 mg/L | 0,26 | ≥500 mg/L | 0,04 | 125 mg/L | 0,32 | 62 mg/L | 0,2 |
| 276 | Cladosporium sphaerospermum | 500 mg/L | 0 | 0 | 0 | 125 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0 |
| 277 | Stagonospora sp. | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 125 mg/L | 0,06 | 62 mg/L | 0 |
| 278 | FNE | ≥1000 mg/L | 0,2 | ≥500 mg/L | 0 | ≥500 mg/L | 0,4 | 62 mg/L | 0,2 |
| 279 | Trichoderma virens | ≥1000 mg/L | 0,8 | ≥500 mg/L | 0,9 | 250 mg/L | 0,6 | 62 mg/L | 0,86 |
| 280 | Trichoderma asperellum | ≥1000 mg/L | 1 | ≥500 mg/L | 0,8 | 250 mg/L | 0,9 | 62 mg/L | 1 |
| 281 | Trichoderma atroviride | ≥1000 mg/L | 0,4 | ≥500 mg/L | 0,54 | 250 mg/L | 1,2 | 31 mg/L | 0,7 |
| 282 | Trichoderma atroviride | ≥1000 mg/L | 1 | ≥500 mg/L | 0,3 | 250 mg/L | 0,9 | 62 mg/L | 0,56 |
| 283 | Issatchenkia orientalis | ≥1000 mg/L | 0,04 | ≥500 mg/L | 0 | 0 | 0 | 125 mg/L | 0,02 |
| 284 | Trichoderma asperellum | ≥1000 mg/L | 1 | ≥500 mg/L | 0,4 | 250 mg/L | 0,74 | 62 mg/L | 0,8 |
| 285 | Trichoderma atroviride | ≥1000 mg/L | 0,9 | ≥500 mg/L | 0,7 | 250 mg/L | 1,1 | 62 mg/L | 0,48 |
| 286 | Trichoderma virens | ≥1000 mg/L | 0,8 | ≥500 mg/L | 0,9 | 250 mg/L | 0,5 | 31 mg/L | 0,5 |
| 287 | Cladosporium cladosporioides | ≥1000 mg/L | 0 | 0 | 0 | 125 mg/L | 0,08 | 62 mg/L | 0,08 |
| 288 | FNE | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 289 | Pichia norvegensis | 250 mg/L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 290 | Cladosporium cladosporioides | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 291 | Rhodotorula mucilaginosa | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 292 | Levedura | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 293 | Candida orthopsilosis | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 294 | Pichia kudriavzevii | ≥1000 mg/L | 0,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 125 mg/L | 0,06 |
| 295 | Issatchenkia orientalis | 250 mg/L | 0,22 | 0 | 0 | 125 mg/L | 0,2 | 0 | 0 |
| 296 | Levedura | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 297 | Metarhizium anisopliae | ≥1000 mg/L | 0,2 | 0,5 | -0,16 | ≥500 mg/L | 0,1 | 62 mg/L | 0,1 |
| 298 | Pichia kudriavzevii | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 299 | Aspergillus restrictus | ≥1000 mg/L | 0,46 | ≥500 mg/L | 0,1 | 250 mg/L | 0,4 | 125 mg/L | 0,2 |
| 300 | Aspergillus sp | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 301 | Pichia norvegensis | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 302 | Phoma macrostoma | ≥1000 mg/L | 0,34 | 62 mg/L | 0,1 | 250 mg/L | 0,3 | 62 mg/L | 0,4 |
| 303 | Trichosporon sp. | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 304 | Cladosporium cladosporioides | ≥1000 mg/L | 0 | 0 | 0 | 62 mg/L | 0,14 | 62 mg/L | 0,06 |
| 305 | Galactomyces geotrichum | 500 mg/L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 62 mg/L | 0 |
| 306 | Cryptococcus humicolus | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 307 | Aspergillus rubrum | 500 mg/L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 308 | Trichoderma atroviride | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 309 | Candida intermedia | ≥1000 mg/L | 0,8 | ≥500 mg/L | 0,3 | 250 mg/L | 0,9 | 62 mg/L | 0,6 |
| 310 | Candida intermedia | ≥1000 mg/L | 0 | 0 | 0 | 250 mg/L | 0,02 | 62 mg/L | 0 |
| 311 | Aspergillus niveoglaucus | 500 mg/L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 62 mg/L | 0,04 |
| 312 | Candida intermedia | ≥1000 mg/L | 0 | 0 | 0 | 62 mg/L | 0 | 125 mg/L | 0 |
| 313 | Trichosporon mycotoxinivorans | ≥1000 mg/L | 0,1 | 125 mg/L | 0 | 0 | 0 | 125 mg/L | 0,1 |
| 314 | Mucor circinelloides | ≥1000 mg/L | 0,6 | ≥500 mg/L | 0,24 | 250 mg/L | 0,66 | ≥250 mg/L | 0,4 |
| 315 | Trichosporon sp. | ≥1000 mg/L | 0,1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 125 mg/L | 0,1 |
| 316 | Candida orthopsilosis | ≥1000 mg/L | 0 | 250 mg/L | 0 | 0 | 0 | 125 mg/L | 0 |
| 317 | Aspergillus niveoglaucus | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 318 | Trichosporon domesticum | ≥1000 mg/L | 0,1 | 125 mg/L | 0 | 0 | 0 | 125 mg/L | 0,1 |
| 319 | Aspergillus restrictus | ≥1000 mg/L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | | | | |
|-----|-----------------------------------|------------|------|-----------|------|-----------|------|----------|------|
| 320 | <i>Galactomyces geotrichum</i> | ≥1000 mg/L | 0,44 | 62 mg/L | 0,3 | 125 mg/L | 0,1 | 125 mg/L | 0,2 |
| 321 | <i>Candida orthopsilosis</i> | ≥1000 mg/L | 0,3 | ≥500 mg/L | 0,24 | ≥500 mg/L | 0,5 | 62 mg/L | 0,2 |
| 322 | <i>Mucor circinelloides</i> | ≥1000 mg/L | 0,4 | ≥500 mg/L | 0,3 | ≥500 mg/L | 0,5 | 62 mg/L | 0,3 |
| 323 | <i>Candida intermedia</i> | ≥1000 mg/L | 0,04 | ≥500 mg/L | 0 | ≥500 mg/L | 0,04 | 62 mg/L | 0,04 |
| 324 | <i>Penicillium griseofulvum</i> | ≥1000 mg/L | 1,3 | ≥500 mg/L | 1,1 | ≥500 mg/L | 1,3 | 125 mg/L | 1,3 |
| 325 | <i>Mucor circinelloides</i> | ≥1000 mg/L | 0,3 | 250 mg/L | 0,18 | 250 mg/L | 0,2 | 62 mg/L | 0,28 |
| 326 | <i>Lecytophora aff. decumbens</i> | ≥1000 mg/L | 0,32 | ≥500 mg/L | 0,2 | ≥500 mg/L | 0,6 | 62 mg/L | 0,2 |
| 327 | <i>Penicillium citreonigrum</i> | ≥1000 mg/L | 0,1 | 125 mg/L | 0,06 | 62 mg/L | 0,08 | 62 mg/L | 0,04 |
| 328 | <i>Cryptococcus humicolus</i> | ≥1000 mg/L | 0 | 0 | 0 | 62 mg/L | 0,04 | 125 mg/L | 0 |
| 329 | <i>Mucor circinelloides</i> | 00/jan | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 330 | <i>Criptococcus sp.</i> | 250 mg/L | 0 | 0 | 0 | 62 mg/L | 0 | 125 mg/L | 0 |
| 331 | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | ≥1000 mg/L | 0 | ≥500 mg/L | 0 | 62 mg/L | 0,04 | 62 mg/L | 0,04 |
| 332 | <i>Trichoderma sp.</i> | ≥1000 mg/L | 1,3 | ≥500 mg/L | 0,4 | ≥500 mg/L | 1,1 | 125 mg/L | 1,3 |
| 333 | <i>Eupenicillium katangense</i> | ≥1000 mg/L | 1,3 | ≥500 mg/L | 0,2 | ≥500 mg/L | 1,3 | 125 mg/L | 1,3 |
| 334 | <i>Penicillium crustosum</i> | ≥1000 mg/L | 0,1 | ≥500 mg/L | 0,06 | 62 mg/L | 0,24 | 15 mg/L | 0,24 |
| 335 | <i>Trichoderma atroviride</i> | ≥1000 mg/L | 1,3 | ≥500 mg/L | 0,06 | ≥500 mg/L | 1,3 | 125 mg/L | 1,3 |
| 336 | <i>Penicillium commune</i> | ≥1000 mg/L | 0,2 | ≥500 mg/L | 0,08 | 62 mg/L | 0,24 | 62 mg/L | 0,24 |
| 337 | <i>Mucor circinelloides</i> | ≥1000 mg/L | 0,2 | ≥500 mg/L | 0,36 | ≥500 mg/L | 0,64 | 62 mg/L | 0,2 |
| 338 | <i>Trichosporon coremiiforme</i> | ≥1000 mg/L | 0,1 | 125 mg/L | 0 | 125 mg/L | 0,1 | 125 mg/L | 0,1 |
| 339 | <i>Trichoderma asperellum</i> | ≥1000 mg/L | 0,26 | ≥500 mg/L | 0 | ≥500 mg/L | 0,04 | 62 mg/L | 0,1 |
| 340 | <i>Penicillium citrinum</i> | ≥1000 mg/L | 0,28 | 250 mg/L | 0,2 | 125 mg/L | 0,3 | 31 mg/L | 0,36 |

ANEXO A

**Authors:**

Lívia Fontes¹, Maria Inês Sato², Cynara Barbosa¹, Vinícius Alves¹, Benedito Correa¹

¹University of São Paulo, Brazil, ²CETESB, Brazil

Presenting Author: Lívia Fontes

Title: Evaluation of capacity of fungal growth, retention and absorption of heavy metals by *Trichoderma* spp. for potential use in bioremediation processes

Abstract: • Background and aims: In Brazil, pollution of water bodies has reached areas beyond the sewage effluents. This has resulted in serious pollution of rivers, lakes and dams. Heavy metals are among the main sources of environmental contamination. In addition, heavy metals such as Lead, Cadmium, Chromium and Mercury are not biodegradable and can enter the food chain causing damage to the health of animals and humans. Methods using microorganisms are less harmful to the environment than physical-chemical methods. Microorganisms, especially fungi, are known for their ability to tolerate, uptake and detoxify heavy metals. *Trichoderma* spp. fungi is an important fungal genus for bioremediation of toxic pollutants, because it is commonly found in the environment and is highly resistant to a wide range of toxic heavy metals, and is therefore an important fungal genus be operated as a genetic resource for use in bioremediation of toxic pollutants. Therefore, the aim of this study was to isolate and to characterize fungal species of the genus *Trichoderma* recovered from aquatic environments, to evaluate its rate of growth compared to heavy metal ions and to assess the ability of retention or absorption of heavy metals in surface and cellular compartments.

• **Methods:** The water and sediments samples were collected from urban rivers in São Paulo State, Brazil. The isolated were selected through preliminary screening. The identification was given by classical methods and sequencing the ITS gene. The selected fungi (40 *Trichoderma* spp.) was tested to assess the rate of radial growth across the following concentrations of Lead (1g/L), Cadmium (0.5 g/L), Chromium (0.250 g/L) and Mercury

(0.125 g/L) in order to get the best strains with potential application in bioremediation processes.

• **Results:** The most prevalent isolates were *T. atroviride* (n = 12), followed by *T. harzianum* (n = 8), *T. asperellum* (n = 7) and others. The strain had higher growth velocity radial front of each of the heavy metals was a strain of *T. harzianum* presenting a Radial Growth Rate 0.9 cm / day (concentration of Pb - 1g / L), RGR 0.7 cm / day (concentration of Cd - 0.5 g / L), RGR 0.8 cm / day (concentration of Cr - 0.25 g / L) and RGR of 0.9 cm / day (concentration of Hg - 125g / L). This strain was subjected to ultra-thin sections and analyzed by transmission electron microscopy demonstrated that all heavy metals were absorbed / retained on the cell surface and / or cellular compartments of the fungus varying function of temperature, time, concentration of metals and pH .

• **Conclusions:** This study presents a great biotechnological potential, since remediation using microorganisms is less damage to the environmet than physical-chemycal methods. The use of these strains in bioremediation studies can open up new application possibilities.

ANEXO B



Title: Evaluation Of Fungal Growth For Potential Application In Bioremediation Of Heavy Metals

Author: L. C. Fontes ¹ , M. Z. Sato ² , V. S. S. Alves ¹ , L. Rocha ¹ , B. Correa ¹ ; ¹Univ. of São Paulo, São Paulo, BRAZIL, ²CETESB, São Paulo, BRAZIL.

Keyword: bioremediation ; heavy metals ; fungi

Abstract:

In Brazil, pollution of water bodies has increased and result in pollution of rivers, lakes and reservoirs in large proportions. Heavy metals are among the most polluting elements. In addition, heavy metals are recalcitrant elements in the aquatic environment. Thus, studies featuring fungus capable of degrading these pollutants are needed. The aim of this study was to isolate and to characterize fungal species in aquatic environments contaminated by heavy metals evaluating its radial growth rate compared to the ions of heavy metals (Lead, Cadmium, Chromium and Mercury).

Materials:

Fungal species resistant to heavy metals Pb, Cd, Cr and Hg were isolated and selected from samples of water and sediment collected from contaminated places by heavy metals (Tietê and Pinheiros rivers and Billings Dam). The identification of isolates was performed by classical methods. The selected fungi was tested to assess the rate of radial growth across the following concentrations of Pb (1g/L), Cd (0.25 g/L), Cr (0.125 g/L) and Hg (0.125 g/L) in order to get the best strains with potential application in bioremediation processes.

Results:

A total of 340 fungal isolates resistant to heavy metals (Pb, Cd, and Hg) were obtained. Among the filamentous fungi (n = 262), the genus *Penicillium* was the most common (n = 51), followed by *Trichoderma* (n = 27), *Aspergillus* (n = 20) and *Fusarium* (n = 14). Among the identified yeast (n=78): *Rhodotorula* (n = 12), followed by *Candida* (n = 3), and *Cryptococcus* (n = 3). The possible use of these strains in bioremediation can open up new application possibilities. *Trichoderma* spp. are the strains that had the fastest growth velocity front each of the heavy metals showing VCR 0.9 cm/day (Pb), VCR 0.7 cm/day (Cd), VCR

0.8 cm/day and VCR 0.9 cm/day (Hg), *Curvularia afinis* with VCR 0.3 cm/day at a concentration of 1g/L - Pb; *Penicillium* sp. with VCR 0.26 cm/day at a concentration of 0.5 g/L - Cd; *Aspergillus* sp. VCR 0.42 cm/day at a concentration of 0,125g/L -Cr and *Microsphaeropsis arundinis* VCR 0.24 cm/day at a concentration of 0,125g/L -Hg.

Conclusion:

This study presents a great biotechnological potential, since remediation using microorganisms has less aggression to the whole ecosystem involved targeting a number of benefits to the environment.

ANEXO C



Research Article

Open Access

Potential Application of Modified *Saccharomyces Cerevisiae* for Removing Lead and Cadmium

Livia de CF*, Mario HB and Benedito C

¹Departamento de Microbiology, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Abstract

Recently, heavy metal pollution has become a worldwide concern. *Saccharomyces cerevisiae* have been used for bioremediation process for heavy metal uptake. In this study, *S. cerevisiae* was genetically modified with the gene EC20 (synthetic phytochelatin) with the purpose to enhance the accumulation capability for Lead (Pb²⁺) and Cadmium (Cd²⁺). *S. cerevisiae* has showed high biosorption capability of Pb²⁺, followed by Cd²⁺. Indeed, the transformed cells exhibited even higher capacity to accumulate lead. TEM (transmission electronic microscopy) images of transformed *S. cerevisiae* showed accumulation of heavy metals on cell wall, which was also verified by EDS (energy dispersive spectrum). There are many mechanisms involved in metal uptake and for some unknown reason. The results of yeast expressing EC20 were better detected when yeast cells were grown in the presence of Pb²⁺ than with Cd²⁺, as clearly observed with the improvement in Pb²⁺ retention by yeast cell wall.

Keywords: Yeast; Genetic modification; Transformation; Heavy metals; Cadmium; Lead uptake

Introduction

In recent years, pollution of wastewater has increased and heavy metals (such as lead and cadmium) are one of the heavy metals in the environment, causing health effects [1-4] and serious environmental problems [5-8]. Mining, industrial and volcanic activities are the main source of heavy metals in environment [9]. In the aquatic system, heavy metal pollution has become an environmental concern, as it is extremely recalcitrant and non-degradable. Even at low concentrations, heavy metals can cause toxicity to humans and other forms of life [5]. It is necessary to uptake these heavy metals from wastewater before its disposal. The toxicity of heavy metals could be transformed from relevant low toxic species into more toxic forms. Moreover, most of the heavy metal salts are soluble in water, hindering some methods of separation (such as, chemical oxidation or reduction, electrochemical treatment, evaporative recovery, filtration, chemical precipitation, ion exchange, membrane technologies, adsorption on activated carbon) [10]. As a result, microbial biomass is an option for developing economic and eco-friendly wastewater treatment process [11,8]. An alternative process is called biosorption that can be defined as the removal of metal from solution by biological material (biosorbents) [12]. These biosorbents can effectively sequester dissolved metal ions of solutions with high efficiency and speed. It also offers several advantages over conventional treatment methods including cost effectiveness, minimization of chemical/biological sludge and regeneration of biosorbent with possibility of metal recovery [13]. Metal polluted environment contains fungi, which has adapted to toxic concentration of heavy metals and become metal resistant [14]. Metals retention by living fungi depends on several factors such as culture conditions and metal concentration [15]. Especially, fungi used for biosorption can be fulfilled by simple physical methods without any damaging the fungi structural integrity [16]. *Saccharomyces cerevisiae* can be easily cultivated using unsophisticated fermentation techniques and inexpensive growth media [17] at large scale or collected from waste of food industries and have become a benchmark in the study of biosorption. Moreover, it is an excellent model microorganism in biological research and its biomass is also considered as safe [18-20]. Therefore, biosorbents made from *S. cerevisiae* can be easily accepted by the public when applied especially to investigate the

interactions of metal-microbe at molecular level [21]. The use of yeasts in model systems is particularly attractive because of the easy genetic manipulation and the availability of the complete genomic sequence knowledge on the molecular biology of the yeast is helpful to identify the molecular mechanism of biosorption in metal ion removal [22-24]. Transformation technique is an important tool in which exogenous DNA is introduced into a cell, resulting in genetic modification. To improve the biosorption capacity of the potential yeast biosorbent, a short metal-binding can be displayed in the cell's surface with purpose to increase its heavy metal biosorption capacity from solutions. Among the heavy metal-binding in the cells, the phytochelatin (PCa) is one of the best studied so far [25]. The EC20 gene encodes a synthetic phytochelatin [25-27]. These peptides bind to metal ions, keeping them on their cell surface [28,29]. To verify the capacity of binding heavy metal on the fungal cell, progress has been made in exploring the cell surface ultra-structure of yeasts owing to the development of techniques such as the transmission electron microscopy with energy-dispersive spectrum analysis (TEM-EDS) [18].

The aim of this study was to modify by genetic transformation a strain of *S. cerevisiae* to improve the biosorption of toxic heavy metals (Lead and Cadmium) and to compare the strain's capacity of retaining heavy metals before the genetic transformation and after that.

Materials and Methods

Saccharomyces cerevisiae and *Escherichia coli* strains and growth media

S. cerevisiae W303-1A (*MATa ade2-1 trp1-1 hts3-1,15 leu2-*

*Corresponding author: Livia de CF, Livia de Carvalho Fontes, Department of Microbiology - University of Sao Paulo, Brazil. Tel: +55-11-30917295; E-mail: liviadfontes@gmail.com

Received September 08, 2015; Accepted October 07, 2015; Published October 10, 2015

Citation: Livia de CF, Mario HB, Benedito C (2015) Potential Application of Modified *Saccharomyces Cerevisiae* for Removing Lead and Cadmium. J Biomed Biolog 6: 313. doi:10.4172/2155-6199.1000313

Copyright: © 2015 Livia de CF, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

3,112 *ura3-1 p+can^r*) strain (R. Rothstein-Columbia University) was cultivated on rich glucose media (YPD - 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) and minimal glucose media (0,67% yeast nitrogen bases, 2% glucose) supplemented with the appropriate auxotrophic supplements. The *E. coli* strain RR1 ($\Delta(gpt-proA)62, leuB6, thi-1, lacY1, hsd_{r,20}, rpsL20 (Str^r), ara-14, galK2, xyl-5, mlf-1, supE44, mcrB_1$) (3183) was cultivated on LB plate (Luria Bertani) supplemented or not with ampicillin for plasmid selection.

EC20 synthesis, vectors construction and yeast transformation

EC20 was assembled from the oligonucleotides pairs EC20-1 and EC20-2 [30-32]. The complementary oligonucleotides were heated at 90°C for 2 min and hybridized, first at 55°C for 30 min followed by 37°C for 30 min. The double stranded fragment was digested, respectively, with BamHI and HtdIII and inserted into Yip351 [33] and YCp22 containing the *TRP1* marker [34] previously cut with the same restriction enzymes. Yip351-EC20 and YCp22-EC20 recombinant plasmids transformed W303-1A yeast strain following the procedure of Schiestl and Gietz [35]. Yip351-EC20 was linearized with HstXI and integrated into chromosomal *LBU2* locus [30].

Recombinant DNA manipulation

Standard methods were used for recombinant DNA manipulations, *E. coli* growth and transformation [36]. The recombinant plasmids Yip351-EC20 and YCp22-EC20 were isolated from *E. coli* in small and medium scale procedures [37,38]. For plasmid sequencing was used the Pure Yield TM Plasmid Mini prep System kit (Promega Co., Madison, WI, USA). The obtained sequences were analyzed using Bio Edit program.

Metal ion solutions and biomass preparation

Two kinds of metal ion solution were used: solutions containing lead and cadmium. Metal ion solutions were made by dissolving analytical $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$ (1g/L) and $CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$ (0,5g/L) in deionized water. The fungal biomass was prepared in Sabouraud broth (Sb) (Oxoid, England), and incubated at 25°C for 5 days, and shaken at 150 rpm. After incubation, the pellets were harvested and washed with double-deionized water, corresponding to live biomass. The pH value of the solutions was adjusted. The conditions were optimized during the preliminary experiments to have all metals in a dissolved aqueous form and to achieve high biosorption capacity of all metal ions.

Transmission electronic microscopy

From the growth of fungi, broth was filtered to obtain biomass that was sent to the microtome sector to obtain the ultrathin sections. The ultrathin sections were examined by electron microscopy (JEOL-1010) at IPEN and ICB department at the University of Sao Paulo. Transmission electron microscopy was performed with the strain of *S. cerevisiae* modified genetically and non-modified in this study with the purpose to reveal the presence of heavy metals in the fungal cell.

Results

Transformation of *Saccharomyces cerevisiae*

With regard to transformation of yeast, *S. cerevisiae* strain was transformed with YCp22-EC20 and Yip351-EC20 recombinant. YCp22-EC20 was chosen for yeast plasmid rescue and it was again sequenced confirming the stability of YCp22-EC20 in yeast. The transformed cells were tested for increased ability to chelate heavy metals into their cell surface, which showed an improvement in

its capability to grow in medium amended with different lead and cadmium concentrations.

Transmission electronic microscopy

Transmission electron microscopy images and EDS analysis of the cells of *S. cerevisiae* showed that heavy metals uptake have increased by transformed yeast cells and also revealed the presence of heavy metals mainly in the cell wall. Comparing to the control (Figure 1), the cells showed a high increase in their Pb^{2+} binding capacity (Figure 2a and b). The micrograph Figure 2a showed a transformed *S. cerevisiae* after genetic transformation and the lead accumulated in the wall cell. The micrograph Figure 2b showed a non-transformed *S. cerevisiae* and the wall cell with less lead accumulated. As indicated above, we observe that *S. cerevisiae* cells have a lower capacity of Cd^{2+} binding than Pb^{2+} binding (Figure 3a and 3b). TEM images and EDS analysis of *S. cerevisiae* grown in the presence of Cadmium after genetic transformation. The micrographs (Figure 2a) showed a transformed *S. cerevisiae* with cadmium accumulated in the wall cell. The micrograph (Figure 2b) showed a non-transformed *S. cerevisiae* and cell wall without cadmium accumulated. No heavy metals were detected in the control. As a result, during biosorption, the cells of *S. cerevisiae* released some substances without strongly damaging the cells integrity. The presence of electron-dense deposits was observed by transmission electron microscopy.

Discussion

Yeast cells have been used in the removal of heavy metal ions from wastewater [39-41]. *S. cerevisiae* could treat all major toxic heavy metals [1]. Metals are frequently internalized by the fungal cell and are accumulated into the vacuoles or can also be bound to low molecular weight proteins such as phytochelatins [41,42]. To improve metal uptake capacity, some techniques of biomass processing have been studied. Most biomass modification techniques described in the literature have shown to improve biosorption ability [43,44]. Metabolism-independent binding of metal ions in yeast cell is usually fast and large amounts of heavy metals can be bound to the cell [1]. In our study, *S. cerevisiae* cells were genetically transformed. Synthetic genes encoding for EC20 were synthesized as described previously [25,32]. According to our study, modified and non-modified strains were used to uptake lead and cadmium from broth. In studies of Bae [25], the EC20 gene was used to

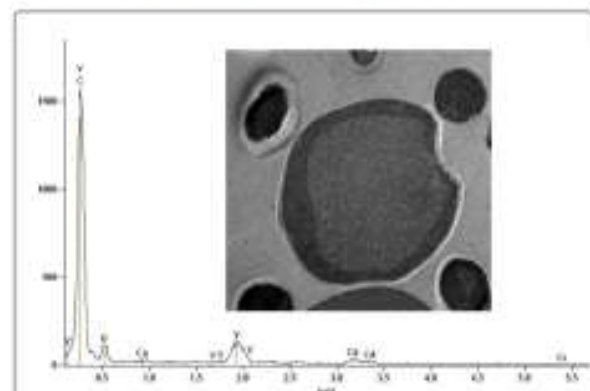


Figure 1: Negative control. TEM images and EDX analysis of *S. cerevisiae* grown in the absence of heavy metals. The micrograph showed a intact cell without damaged and EDX without peaks of Pb and Cd confirmed.

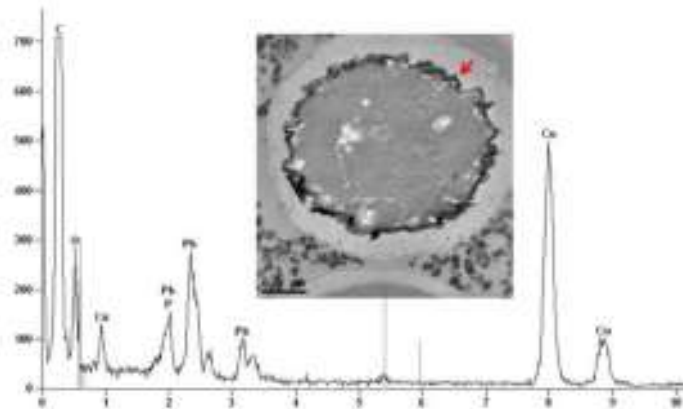


Figure 2a

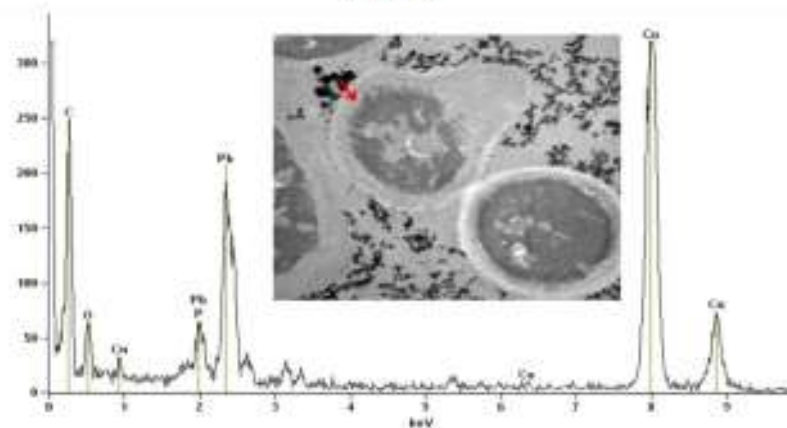


Figure 2b

Figure 2: TEM images and EDS analysis of *S. cerevisiae* grown in the presence of Lead. Lead in *Saccharomyces cerevisiae* after (a) and before (b) genetic transformation. The micrographs showed (2a) a transformed *S. cerevisiae*. On figure 2a, the arrow shows the lead accumulated in the wall. The micrograph (2b) showed a non-transformed *S. cerevisiae*. On figure 2b, the arrow shows the wall cell with less lead accumulated. On both figures, EDS analysis confirms the presence of lead on the local showed by the arrow.

anchor EC20 on the surface of the cells, providing an increase in their heavy metal binding capacity. Furthermore, Blondo et al. [32] described the effects of the cell surface display of a synthetic phytochelatin in *Cupriavidus metallidurans* for enhanced metals bioremediation. Great progress has been made in exploring the cell surface ultra-structure of yeasts owing to the development of techniques such as the transmission electron microscopy with energy-dispersive spectrum analysis (TEM-EDS). In our experiments the majority of accumulated Pb^{2+} was found in the cell wall, indicating the involvement of functional groups of cell wall [45-47], in sequestering the Pb^{2+} ions. Moreover, Brady and Duncan [47] also found that biosorption can be achieved through complexation by cell wall and membrane hydroxylated components. Kunst and Roomans [48] found polyphosphate granules localized in

or close to the cell vacuoles, which are the major storage vesicles for heavy metal ions in *S. cerevisiae*. Orlovich and Ashford [49] followed up on aforementioned studies and determined the exact vacuolar location for polyphosphate granules incorporation. Favero et al. [50] found that 80% of Cd^{2+} was bound to the hyphal cell walls in their study of *Pleurotus ostreatus*. In summary, the potential advantages in use of fungal biomass especially *S. cerevisiae* certainly could be applied for treatment of large scale heavy metals pollutants without the generation of toxic sludge. In the same context, genetic manipulation of *S. cerevisiae* could to increase the biosorption of heavy metals.

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

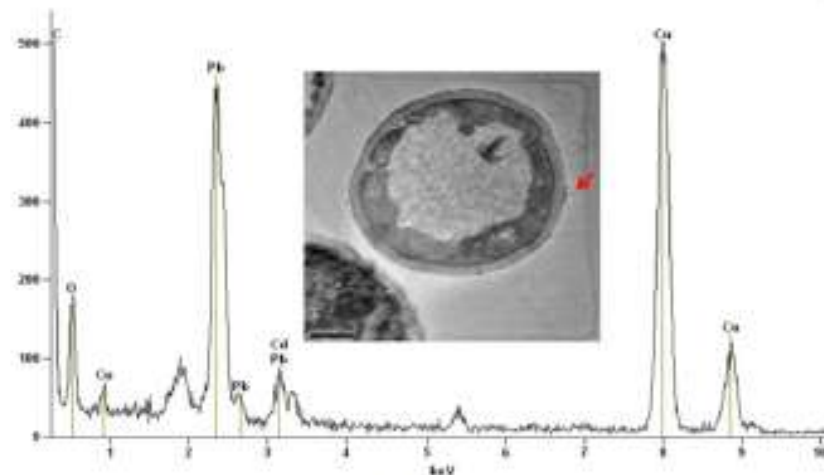


Figure 3a

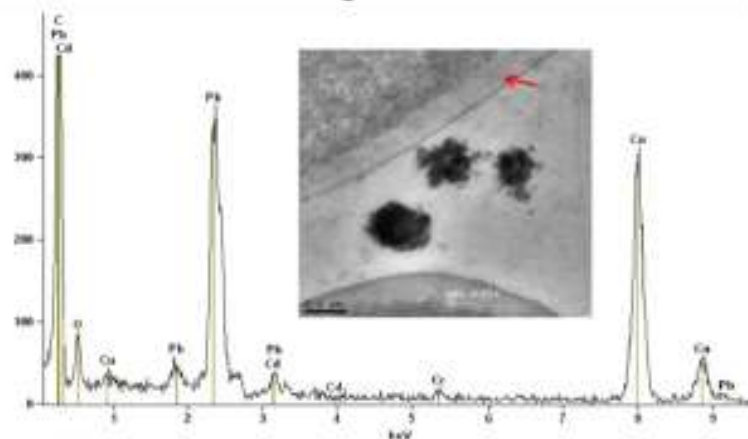


Figure 3b

Figure 3: TEM images and EDS analysis of *S. cerevisiae* grown in the presence of Cadmium. Cadmium in *Saccharomyces cerevisiae* after (A) and Before (B) Genetic transformation. The micrographs showed (2a) a transformed *S. cerevisiae*. On figure 2a, the arrow shows the cadmium accumulated in the wall cell. The micrograph (2b) showed a non-transformed *S. cerevisiae*. On figure 2b, the arrow shows the wall cell without cadmium accumulated. On both figures, EDS analysis confirm the presence/absence of cadmium on the focal showed by the arrow.

References

- Thippeswamy B, Shivakumar CK, Krishnaappa M (2014) Study on heavy metals bioadsorption ability of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int Journ Biol Research*, 2: 106-115.
- Hu H, Jin Q, Kava P (2014) A Study of Heavy Metal Pollution in China: Current Status, Pollution-Control Policies and Countermeasures. *Sustainability* 6: 5820-5838.
- Martin S, Griswold W (2009) Human health effects of heavy metals. *Environ Sci Technol* 43: 1-6.
- Ahalya N, Ramachandra TV, Kanamadi RD (2003) Bioadsorption of heavy metals. *Res J Chem Environ* 7: 71-78.
- Monachese M, Burton JP, Reid G (2012) Bioremediation and Tolerance of Humans to Heavy Metals through Microbial Processes: a Potential Role for Probiotics? *Appl Environ Microbiol*, 78: 1863-1870.
- Bishop PL (2002) Pollution prevention: fundamentals and practice. Beijing: Tsinghua University Press.
- Wang JL (2002a) Immobilization techniques for biocatalysts and water pollution control. Beijing: Science Press.
- Volesky B (1990a) Bioadsorption and bioabsorbents. In: Volesky B, editor. *Bioadsorption of Heavy Metals*. Florida: CRC press, 3-5.
- Sahni BK (2011) Hazardous metals and minerals pollution in India. Indian National Science Academy. New Delhi, 29.
- Tiekova K, Petrov G (2002) Removal of heavy metals from aqueous solution using *Rhizopus delmar* mycelia in free and polyurethane-bound form. *Z. Naturforsch*, 57: 629-633.

Citation: Livia de CF, Mario HB, Benedito C (2015) Potential Application of Modified *Saccharomyces Cerevisiae* for Removing Lead and Cadmium. *J Bioremed Biodeg* 6: 313. doi:10.4172/2155-6199.1000313

Page 5 of 5

11. Veglio F, Beolchini F (1997) Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy* 44: 301-16.
12. Gadd GM (1998) Interactions of fungi with toxic metals. *Phytologist*, 124: 25-60
13. Shoaib A, Aslam N, Aslam N (2012) Myco and Phyto Remediation of Heavy Metals from Aqueous Solution. *The Online Journal of Science and Technology* 2: 3.
14. CeolA, Kerans M, Hiller S, Persiani AM, Gadd GM (2015) Fungalbioweathering1 of mimette and a general geomycological model for lead apatite mineral biotransformations. *Appl Environ Microbiol*.
15. Meigar MJ, Alonso J, Garcia MA (2007) Removal of toxic metals from aqueous solutions by fungal biomass of *Aspergillus Macrospores*. *Science of the Total Environment* 385: 12-19.
16. Adeyemi AO (2009) Bioaccumulation of arsenic by fungi. *American Journal of Environmental Science* 05: 364-370.
17. Kapoor A, Vinaraghavan T (1995) Fungi biosorption-an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. *BioresourTechnol* 53: 195-206.
18. Chen C, Wenb D, Wang J (2014) Cellular surface characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* before and after Ag(I) biosorption.
19. Ferreira I, Pinho O, Vieira E, Taveira JG (2010) Brewer's *Saccharomyces yeast biomass*: characteristics and potential applications. *Trends Food Sci Technol*. 21: 77-84.
20. Chen C, Wang JL (2010) Removal of heavy metal ions by waste biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Environ. Eng.* 136: 95-102.
21. Zhou DQ (2002) *Microbiology* (2ndedn). Beijing: Higher Education Press.
22. Eide DJ (1998) The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Nutr*, 18: 441-60.
23. Eide D (1997) Molecular biology of iron and zinc uptake in eukaryotes. *Curr Opin Cell Biol* 9: 573-7.
24. Perigo P, Howell SB (1997) Molecular mechanisms controlling sensitivity to toxic metal ions in yeast. *Toxicol. Appl Pharmacol*. 147: 312-8.
25. Bae W, Mulchandani A, Chen W (2002) Cell surface display of synthetic phytochelatin using ice nucleation protein for enhanced heavy metal bioaccumulation. *Journal of Inorganic Biochemistry* 88: 223-227.
26. Bae W, Wu CW, Kostal J, Mulchandani A, Chen W (2003) Enhanced mercury biosorption by bacterial cells with surface-displayed MerR. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3176-80.
27. Bae W, Mehra RK, Mulchandani A, Chen W (2001) Genetic engineering of *Escherichia coli* for enhanced uptake and bioaccumulation of mercury. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 5335-8.
28. Cobbett C, Goldsbrough P (2002) Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 53: 159-182.
29. Mejare M, Bulow L (2001) Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends Biotechnol* 19: 67-70.
30. Rothstein RJ (1983) *Methods Enzymol*. 101: 202-211.
31. Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* 166: 557-580.
32. Blondo R, Silva FA, Vicente EJ, Sarkis JES, Schenberg ACG (2012) Synthetic Phytochelatin Surface Display in *Cupriavidus metallidurans* CH34 for Enhanced Metals Bioremediation. *Environ Sci Technol*. 46: 8325-8332.
33. Hill JE, Myers A, Koerner TJ, Tzagoloff A (1986) *Yeast*. 2: 163-167.
34. Gleib RD, Sugino A (1988) *Gene*. 74: 527-534.
35. Schiestl RH, Gleib RD (1989) *Curr Genet* 15: 339-346.
36. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
37. Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7: 1513-1523.
38. Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J et al. (1989) *Current protocols in molecular biology*. [s.l.: s.n.].
39. Gadd GM (2009) Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *J Chem Technol Biotechnol*. 84: 13-28.
40. Wang JL, Chen C, (2009) Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnol Adv*. 27: 195-226.
41. Volesky B, May-Phlips HA (1995) Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 42: 797-806.
42. Krauter P, Martinelli R, Williams K, Martins S (1996) Removal of Cr(VI) from ground water by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biodegradation*, 7: 277-286.
43. Shroff KA, Vaidya VK (2011) Effect of pre-treatments on biosorption of Ni (II) by dead biomass of *Mucorhiemalis*. *Eng in Life Sci*. 11: 588-597.
44. Yan G, Vinaraghavan T (2000) Effect of pre-treatment on the of heavy metals on *Mucormucilli*. *Water SA*, 26: 119-123.
45. Gadd GM (1993) Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol*. 124: 25-60.
46. Ashkenazy R, Gottlieb L, Yannai S (1997) Characterization of acetone-washed yeast biomass functional groups involved in lead biosorption. *Biotechnol Bioeng*. 55: 1-10.
47. Brady D, Duncan JR (1994) Binding of heavy metals by the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol*. 16: 633-638.
48. Kuret L, Roomans GM (1985) Intracellular localization of heavy metals in yeast by X-ray microanalysis. *Scan Electron Micros*. 1: 191-199.
49. Orlovich DA, Ashford AE (1993) Polyphosphate granules are an artefact of specimen preparation in the actinomycothizal fungus *Pleothus thiotorus*. *Protoplasma* 173: 91-102.
50. Favero N, Costa P, Massimino ML (1991) In vitro uptake of cadmium by basidiomycetes *Pleurotusastratus*. *Biotechnol Lett*. 13: 701-704.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12221971>

Citation: Livia de CF, Mario HB, Benedito C (2015) Potential Application of Modified *Saccharomyces Cerevisiae* for Removing Lead and Cadmium. *J Bioremed Biodeg* 6: 313. doi:10.4172/2155-6199.1000313

OMICS International: Publication Benefits & Features

Unique Features:

- Increased global visibility of articles through worldwide distribution and indexing
- Showcasing recent research output in a timely and updated manner
- Special issues on the current trends of scientific research

Special Features:

- 700 Open Access Journals
- 20,000 Editorial team
- Rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing or PubMed (partial), Scopus, EBSCO, Index Copernicus, Google Scholar etc.
- Sharing Options: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript on <http://www.omicsonline.org/submit.html>